



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INTERAÇÕES MEDIADAS QUIMICAMENTE ENTRE
LEPIDOPTERA E ESPÉCIES DE PIPERACEAE**

Marcilio Wagner Fontes Silva

Recife

Fevereiro, 2017

INTERAÇÕES MEDIADAS QUIMICAMENTE ENTRE LEPIDOPTERA E ESPÉCIES DE PIPERACEAE

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador: Clécio Souza Ramos

Bolsista FACEPE

Recife,
Fevereiro, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

L732p Silva, Marcilio Wagner Fontes
Interações mediadas quimicamente entre Lepidoptera e espécies de Piperaceae /
Marcilio Wagner Fontes Silva. – 2017.
78 f. : il.

Orientador: Clécio Souza Ramos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa
de Pós-Graduação em Química, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. Metabolismo 2. Compostos secundários 3. Lepidópteros 4. Piper 5. Amida
I. Ramos, Clécio Souza, orient. II. Título

CDD 540

Marcilio Wagner Fontes Silva

**INTERAÇÕES MEDIADAS QUIMICAMENTE ENTRE
LEPIDOPTERA E ESPÉCIES DE PIPERACEAE**

DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA EM:

24 /02/ 2017

Prof. Dr. Clécio Souza Ramos (DQ-UFRPE)
Orientador

Prof. Dr. João Rufino de Freitas Filho (DQ-UFRPE)
1º Examinador

Dr. Marcilio Martins de Moraes
2º Examinador

Prof. Dr. André Augusto Pimentel Liesen Nascimento (DQ-UFRPE)
Suplente

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Marisene e Valdeci, a minha noiva Isaura e a minha sogra Auristele (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por todas as dádivas concebidas em minha vida e pelas pessoas que encontrei ao longo da minha trajetória.

Agradeço aos meus pais, Valdeci Lemos Silva e Marisene Cavalcante de Fontes Silva e minha irmã, Lizandra Kelly, por serem exemplos de cidadãos de bem, pela educação, valores morais, amor, carinho, esforço, paciência e apoio pelo seu apoio, respeito, amor e carinho, por todo apoio e sacrifícios realizados para que esta conquista fosse viável.

Agradeço a minha tia Raimunda Moura, aos primos Mércia Valéria e Deyvirton Denis e minha avó, Josefa Cavalcante, por me receber de portas abertas em suas residências, e me tratarem como um filho e irmão durante o todo este tempo.

Agradeço pelo Prof. Dr. Clécio Souza Ramos pela oportunidade concedida de ingressar em seu grupo de pesquisa, pelas orientações, paciência e ensinamentos concedidos ao longo do tempo.

Agradeço aos amigos Rodolfo Rodrigues, Marcilio Martins, Leonardo e Gisele por sempre estarem solícitos em ajudar, tirar eventuais dúvidas, pela paciência, pela troca de conhecimento realizada durante esta jornada.

Agradeço a Isaura Gomes, minha noiva, pelas correções ortográficas e gramaticais neste trabalho e pela paciência em todos esses anos.

Agradeço ao CENAPESQ pela realização das análises.

A FACEPE pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

Agradeço pelo apoio, contribuições e pensamento positivo dos amigos do LEQS: Mauriceia, Aldicéia, Raphaela, Luiz Alberto, Andresa, João Rufino, Gisele, Leonardo. Aos amigos do LPNBio: Milena Martins, Marcilio Martins, Caroline Araújo e Marilhes.

Aos amigos da UFRPE: Vinicius, Yasmine França, Halana Justino, Thais Menezes, Carolina Alves, Marcio Gomes, Iedja Firmino, Wildstar Medonça e Eduardo, Filipe, Calissa.

Interações mediadas quimicamente entre Lepidoptera e espécies de Piperaceae

Resumo

Os primeiros insetos no registro fóssil, datados da metade do período Carbonífero, indicam que estes eram saprófagos e não herbívoros. O hábito de se alimentar de plantas verdes surgiu durante a co-evolução de insetos e plantas. Em resposta à mudança no hábito saprófago dos insetos, plantas desenvolveram defesas químicas contra eles pela acumulação de compostos tóxicos conhecidos como metabólitos secundários. Na tentativa de superar a defesa química de plantas, os insetos desenvolveram estratégias que permitiram ter uma dieta de tecidos de plantas. Até o momento, não é completamente elucidado como este processo ocorre, mas há evidências de que os insetos desenvolveram a capacidade de usar o mecanismo de biotransformação para desintoxicar essas substâncias de defesa das plantas. No intuito de contribuir para o entendimento de especificidade química entre insetos e plantas, o presente trabalho foi direcionado para investigar as possíveis biotransformações de metabólitos secundários de espécies de *Piper* por insetos, considerando que folhas de *Piper* acumulam compostos como amidas e fenilpropanoides, que possuem propriedades aleloquímicas. As folhas das espécies de *Piper aduncum*, *P. marginatum*, *P. tuberculatum* e *P. caldense*, que contém fenilpropanoides, amidas/fenilpropanoides, amidas e ácidos benzoicos prenilados foram adicionadas a dieta de espécies de lepidópteros. Os resultados obtidos mostrou que a amida (*E*)-piplartina, abundante em folhas de *P. tuberculatum* e conhecida devido a seu potencial biológico, incluindo atividade inseticida, sofreu biotransformação durante o processo digestivo das lagartas *Heraclides brasilienses* e *Gonodonta sp1*, no respectivo (*E*)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila. Em relação ao fenilpropanoide dilapiol, um potente inseticida natural, encontrado em abundância em *P. aduncum*, não houve biotransformação durante o processo digestivo das larvas de lepidópteras *Quadrus u-lucida* e *Gonodonta fulvidens*. No que se refere aos fenilpropanoides majoritários *E*-asarona, *Z*-asarona e apiol presentes nas

folhas de *P. marginatum*, também não foram encontrados indícios de biotransformação durante seu metabolismo pelas lagartas *Q. u-lucida*, *H. brasilienses* e *ENI 1*. O mesmo foi observado em relação ao ácido 3-geranilgeranila-4-hidroxibenzoico, encontrado nas folhas de *P. caldense*, onde não foram encontradas evidências de biotransformação durante o metabolismo pela lagarta *Gonodonta sp2*. Os resultados obtidos contribuíram para ampliar o conhecimento sobre o metabolismo de compostos com propriedades inseticidas de *Piper* em insetos, principal objeto do estudo sistemático do nosso grupo de pesquisa.

Palavras-chaves: Metabolismo, compostos secundários, lepidópteros, *Piper*, amida.

Chemically mediated interactions between Lepidoptera and Piperaceae species

Abstract

The fossil record of the first insects, dating to half of the Carboniferous Period, indicate that these were saprofaunous and not herbivorous. The habit of feeding on green plants arose during the coevolution of insects and plants. In response to change in saprofaunous habit of insects, plants have developed chemical defenses against them by the accumulation of toxic compounds known as secondary metabolites. In an attempt to overcome plant chemical defense, insects developed strategies that allowed them to have a plant tissue diet. So far it is not completely elucidated how this process occurred, but there is evidence that insects have developed the ability to use the biotransformation mechanism to detoxify these plant defense substances. In order to contribute to the understanding of chemical specificity between insects and plants, the present work was directed to elucidate the possible biotransformations of secondary metabolites of *Piper* species by insects, considering that *Piper* leaves accumulate compounds as amides and phenylpropanoids, which have allelochemical properties. Leaves of the species *Piper aduncum*, *P. marginatum*, *P. tuberculatum* and *P. caldense*, which accumulate phenylpropanoids, amides / phenylpropanoids, amides and benzoic acids prenylated were added to the diet of lepidopteran species. The results obtained showed that the pipartin amide, abundant in leaves of *P. tuberculatum* and known due to its biological potential, including insecticidal activity, was biotransformation during the digestive process of the caterpillars *Heraclides brasilienses* and *Gonodonta sp1* in the respective ester 3,4,5 trimethoxycinnamate. In relation to the phenylpropanoid dilapiol, a potent natural insecticide, found in abundance in *P. aduncum*, there was no biotransformation during the digestive process of lepidopteran larvae *Quadrus u-lucida* and *Gonodonta fulvidens*. As for the major phenylpropanoids E-asarone, Z-asarone and dilapiol present in leaves of *P. marginatum*, no evidence of biotransformation was also found during its metabolism by the Q. u-

lucida, *H. brasilienses* and ENI 1 caterpillars. The same was observed for 3-geranyl-geranyl-4-hydroxybenzoic acid, found in leaves of *P. caldense*, where no evidence of biotransformation was found during metabolism by the *Gonodonta sp2* caterpillar. The results obtained contribute to increase the knowledge about the metabolism of compounds with insecticidal properties of Piper in insects, main object of the systematic study of our research group.

Sumário

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 | Interação planta-inseto | 17 |
| 1.2 | Compostos de defesa química em plantas | 18 |
| 1.3 | Lepidópteros | 22 |
| 1.4 | Adaptação de insetos a defesa química das plantas | 24 |
| 1.4.1 | Enzimas de desintoxicação para insetos | 24 |
| 1.4.2 | Glicosilação | 28 |
| 1.4.3 | Sequestro de compostos de defesa | 32 |
| 1.5 | Família Piperaceae | 33 |
| 1.6 | <i>Piper</i> | 35 |
| 1.7 | Interação entre espécies do gênero <i>Piper</i> e lepidópteros | 38 |
| 2 | OBJETIVOS | 42 |
| 2.1 | Objetivo geral | 42 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 42 |
| 3 | METODOLOGIA | 43 |
| 3.1 | Coleta do material botânico | 43 |
| 3.2 | Coleta do material entomológico | 43 |
| 3.3 | Obtenção do extrato das folhas | 43 |
| 3.4 | Obtenção dos extratos do material fecal | 43 |
| 3.5 | Cromatografia gasosa acoplada ao espectrometria de massas (CG-EM) | 44 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 4.1 | Lepidópteros associados à Piperaceae | 45 |
| 4.2 | Estudo dos constituintes das folhas de Piperaceae metabolizado por Lepidópteros | 47 |
| 4.2.1 | <i>Piper aduncum</i> | 47 |
| 4.2.2 | <i>Piper marginatum</i> | 51 |
| 4.2.3 | <i>P. caldense</i> | 55 |
| 4.2.4 | <i>Piper tuberculatum</i> | 57 |
| 5 | CONCLUSÃO | 65 |
| 6 | PERSPECTIVAS | 67 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 68 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estruturas de glicosídeos cianogênicos e seus precursores biossintéticos. | 21 |
| Figura 2. Estruturas de glicosinolatos. | 22 |
| Figura 3. Hidrólise enzimática de glicosídeos cianogênicos. | 25 |
| Figura 4. Metabolismo da epivolkenina em tiol epivolkenina pela lagarta <i>H. sara</i> | 25 |
| Figura 5. Mecanismos de desintoxicação do HCN. | 26 |
| Figura 6. Formas tóxicas e não tóxica da senecionina encontrados na natureza. | 27 |
| Figura 7. Biotransformação da (+)-(1 <i>R</i>)-cânfora por <i>S. litura</i> | 28 |
| Figura 8. Biotransformação de Xantotoxina por <i>S. frugiperda</i> e <i>P. polyxenes</i> . .. | 28 |
| Figura 9. Metabolismo da 6-metoxi-2-benzoxazolinona por <i>S. frugiperda</i> | 29 |
| Figura 10. Metabolismo da capsaicina por <i>H. assulta</i> | 30 |
| Figura 11. Metabolismo da quecertina por <i>B. mori</i> | 31 |
| Figura 12. Metabolismo do timol por <i>S. litura</i> e <i>T. ni</i> | 31 |
| Figura 13. Plantas da família Piperaceae e seus frutos. | 34 |
| Figura 14. Variedade de classes de metabólitos secundários encontradas em espécies de <i>Piper</i> | 37 |
| Figura 15. Metabólitos secundários de defesa química presentes em <i>Piper</i> | 38 |
| Figura 16. Derivados obtidos a partir do metabolismo do safrol por <i>H. brasilienses</i> | 39 |
| Figura 17. Metabolismo da (-)-grandisina pelas lagartas das borboletas <i>Quadrus u-lucida</i> e <i>H. brasilienses</i> | 40 |
| Figura 18. Metabolismo do 4-nerolidilcatecol por <i>H. brasilienses</i> | 41 |
| Figura 19. Lepidópteros que se alimentam de folhas de <i>Piper</i> | 45 |
| Figura 20. Perfil químico das folhas de <i>P. aduncum</i> | 47 |
| Figura 21. Espectro de massas do dilapiol. | 48 |
| Figura 22. Ciclo de vida <i>G. fluvidens</i> em folhas de <i>P. aduncum</i> | 49 |
| Figura 23. Perfil químico das folhas de <i>P. aduncum</i> e dos extratos fecais dos lepidópteros. | 50 |

| | |
|--|----|
| Figura 24. Perfil químico do extrato das folhas de <i>P. marginatum</i> | 51 |
| Figura 25. Espectro de massas dos fenilpropanoides (<i>E</i>)-asarona, (<i>Z</i>)-asarona e apiol identificados em <i>P. marginatum</i> | 52 |
| Figura 26. Perfil químico das folhas de <i>P. marginatum</i> e do material fecal dos lepidópteros. | 54 |
| Figura 27. Perfil químico do extrato das folhas de <i>P. caldense</i> | 55 |
| Figura 28. Espectro de massas do ácido 3-geranil-geranila-4-hidroxibenzoico. | 56 |
| Figura 29. Perfis químicos das folhas de <i>P. caldense</i> e do material fecal de <i>Gonodonta sp2</i> | 56 |
| Figura 30. Perfil químico das folhas de <i>P. tuberculatum</i> por CG-EM. | 57 |
| Figura 31. Amidas encontradas em <i>P. tuberculatum</i> | 58 |
| Figura 32. Proposta de fragmentação do isômero (<i>E</i>)-piplatina. | 59 |
| Figura 33. Perfis químicos das folhas de <i>P. tuberculatum</i> e dos materiais fecais dos lepidópteros..... | 61 |
| Figura 34. Espectro de massas dos compostos metabolizados..... | 62 |
| Figura 35. Proposta de fragmentação do (<i>E</i>)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila. | 63 |
| Figura 36. Metabolismo do trans-anetol por larvas de <i>S. litura</i> | 64 |

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Ocorrência de lepidopteros em Piperaceae. | 46 |
|--|----|

Lista de sigla e abreviaturas

- CCD - Cromatografia em Camada Delgada
- CG-EM - Cromatografia Gasosa Acoplada ao Epectrômetro de Massas
- T_R - Tempo de Retenção
- CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CL₅₀ - Concentração letal de 50%
- CL₉₀ - Concentração letal de 90%
- EM - Espectrometria de Massas

1 INTRODUÇÃO

1.1 Interação planta-inseto

Os insetos são os seres vivos mais numerosos e habitam praticamente todos os ambientes do planeta. Estima-se que 60% da biodiversidade do planeta pertencem à classe Insecta, destes 46% são herbívoros (CRONIN e ABRAHAMSON, 2001). Segundo estudos, fósseis dos primeiros insetos datam da metade do período Carbonífero e revelam o hábito saprófago destes organismos, diferindo do hábito herbívoro de grande parte desses animais. Ao longo do período da co-evolução entre planta-inseto, alguns insetos passaram a se alimentar de tecidos frescos das plantas.

Em resposta ao ataque dos insetos, algumas plantas desenvolveram mecanismos de resistências contra estes, isto é, ocorreram mudanças morfológicas e fisiológicas, como tecidos mais rígidos, espinhos e pêlos, e principalmente desenvolveram capacidade de biossíntese de compostos químicos com propriedades de semioquímicos, incluindo os aleloquímicos e toxinas. A maioria destes compostos é conhecida como os metabólitos secundários, que são associados à defesa química da planta, que defendem não só contra insetos, mas a todo organismo que venha-lhe causar injúrias (MCEVOY, 2002; WÖLL *et al.*, 2013).

Em contrapartida, os insetos fitófagos desenvolveram mecanismos capazes de superarem as defesas químicas e físicas das plantas, que resultou em sua adaptação a dieta diária constituída de plantas que acumulam semioquímicos (GLENDINNING, 2002). O principal mecanismo conhecido, usado por insetos para superar a defesa química de planta, é a modificação química de compostos tóxicos durante o processo digestivo do inseto para suas formas menos tóxicas ou não tóxicas (WÖLL *et al.*, 2013). O custo energético gasto pelos insetos para superar as defesas químicas de plantas é compensado pelo valor nutricional e servindo como: ambiente de proteção, condições de reprodução apropriadas e desenvolvimento dos insetos (RYAN e BYRNE, 1988; WÖLL *et al.*, 2013; SCHULER e BERENBAUM, 2013).

A maioria dos insetos herbívoros usa um número limitado de plantas, que geralmente pertencem a mesma família ou gênero. Apesar da grande diversidade de insetos fitófagos, menos de 10% destes realizam dieta com plantas pertencentes a três famílias diferentes (VOELCKEL, 2014). Essa especificidade é associada a dois fatores: o primeiro deles nutricional, pois metabólitos primários como aminoácidos, lipídeos e carboidratos são essenciais para a manutenção dos insetos, sendo obtidos a partir das plantas; e o segundo deles, a presença de metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, que podem ser usados como infoquímicos ou aleloquímicos pelos insetos (NISHIDA, 2014; RASMANN; ALVAREZ; PELLISSIER, 2014; WÖLL *et al.*, 2013).

1.2 Compostos de defesa química em plantas

As plantas possuem defesas limitadas contra ataques, uma vez que não possuem capacidade de locomover-se quando ameaçadas e, não possuem sistema imunológico capaz de lidar com ataques de microorganismos (SIMÕES, *et al.*, 2004; WÖLL *et al.*, 2013). Assim, especula-se que ao longo do tempo, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa química contra herbívoros e patógenos produzindo compostos que afetam diretamente o comportamento e desenvolvimento desses organismos (WÖLL *et al.*, 2013).

Os compostos de defesa química, também conhecidos como compostos secundários ou metabólitos secundários são compostos produzidos a partir das rotas biossintéticas do acetato, chiquimato, mevalonato, fosfato de deoxixilulose e rotas mistas (DEWICK, 2009). Os compostos secundários em plantas podem ser encontrados em folhas, raiz, caule, frutos e inflorescências e, estes tecidos podem apresentar perfis químicos de compostos secundários idênticos ou diferenciados. Os três maiores grupos de metabólitos secundários associados a mecanismos de defesa das plantas são compostos fenólicos, compostos contendo nitrogênio e terpenos, (MCLEAN e DUNCAN, 2006).

Os terpenos são compostos que apresentam alta volatilidade e aroma característico, sendo estes, principais constituintes dos óleos essenciais de plantas e presentes em animais, oriundos de duas rotas: mevalonato e fosfato

deoxixilulose, que produzem como blocos de construção unidades C5 conhecidas como unidades isoprênicas. A junção destas unidades formam as classes de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos e carotenóides (DEWICK, 2009; TAIZ e ZEIGER, 2006).

Os compostos fenólicos correspondem ao segundo maior grupo de metabólitos secundários, apresentando uma grande diversidade estrutural. A unidade básica destas moléculas é o anel aromático (biossintetizado a partir das rotas do chiquimato e acetato) e apresenta de uma hidroxila ligada a este anel (ALU'DATT *et al.*, 2017; DEWICK, 2009; VERMA e SHUKLA, 2015). Os compostos fenólicos são divididos de acordo com seu esqueleto básico em: fenóis simples (C6), benzoquinonas (C6), ácidos fenólicos (C6-C1), acetofenonas (C6-C2), ácidos fenilacéticos (C6-C2), fenilpropanoides (C6-C3), derivados do ácido cinâmico (C6-C3), cumarinas (C6-C3), isocumarinas (C6-C3), naftoquinonas (C6-C4), lignanas (C6-C3)₂ ligninas (C6-C3)_n, xantonas (C6-C1-C6), antraquinonas (C6-C2-C6), estilbenos (C6-C2-C6), flavonóides (C6-C3-C6), isoflavonóides (C6-C3-C6), biflavonóides (C6-C3-C6)₂ e os taninos hidrolisáveis (C6-C1-C6)_n e condensados (C6-C3-C6)_n, , que possuem diversas atividades biológicas incluindo a atividade antioxidante e inseticida (ALU'DATT *et al.*, 2017, DEWICK, 2009).

As três principais categorias compostos nitrogenados associados a defesa química das plantas são: alcaloides, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos (VERMA e SHUKLA, 2015). Os alcaloides podem ser derivados de aminoácidos ornitina, lisina, tirosina, triptofano e histidina, derivados da purina, ácidos nicotínico e antranílico ou derivados de reações de transaminação (terpenos, fenilalanina) (DEWICK, 2009). Estes apresentam distribuições restritas a poucas famílias de plantas como, por exemplo, os tropanos presentes em Solanaceae e Convolvulaceae e pirrozilidínicos distribuídos nas famílias Asteraceae (*Senecio*, *Eupatorium*) Boraginaceae (*Heliotropium*), Fabaceae (*Crotalaria*), Apocynaceae (*Parsonsia*, *Prestonia*) e Orchidaceae (*Phalaenopsis*) conhecidos por apresentar toxicidade aos insetos e deterrência alimentar (HARTMANN *et al.*, 2005).

Os glicosídeos cianogênicos são oriundos de aminoácidos alifáticos e aromáticos, como por exemplo: valina (linamarina em folhas de *Lotus corniculatus* Fabaceae), isoleucina (a lotaustralina encontrada na mandioca, *Manihot esculenta*, Euphorbiaceae), tirosina (dhurrina encontradas em *Sorghum bicolor*, Poaceae), fenilalanina (prunasina em *Prunus serotina*) e leucina (heterodendrina em espécies de *Acacia*, Fabaceae) (DEWICK, 2009) (Figura 1). Quando hidrolisados liberam HCN um composto altamente tóxico para herbívoros. Estes estão presentes em mais de 2.500 espécies de plantas incluindo pteridófitas, gminospermas e angiospermas (ZAGROBELNY *et al.*, 2004).

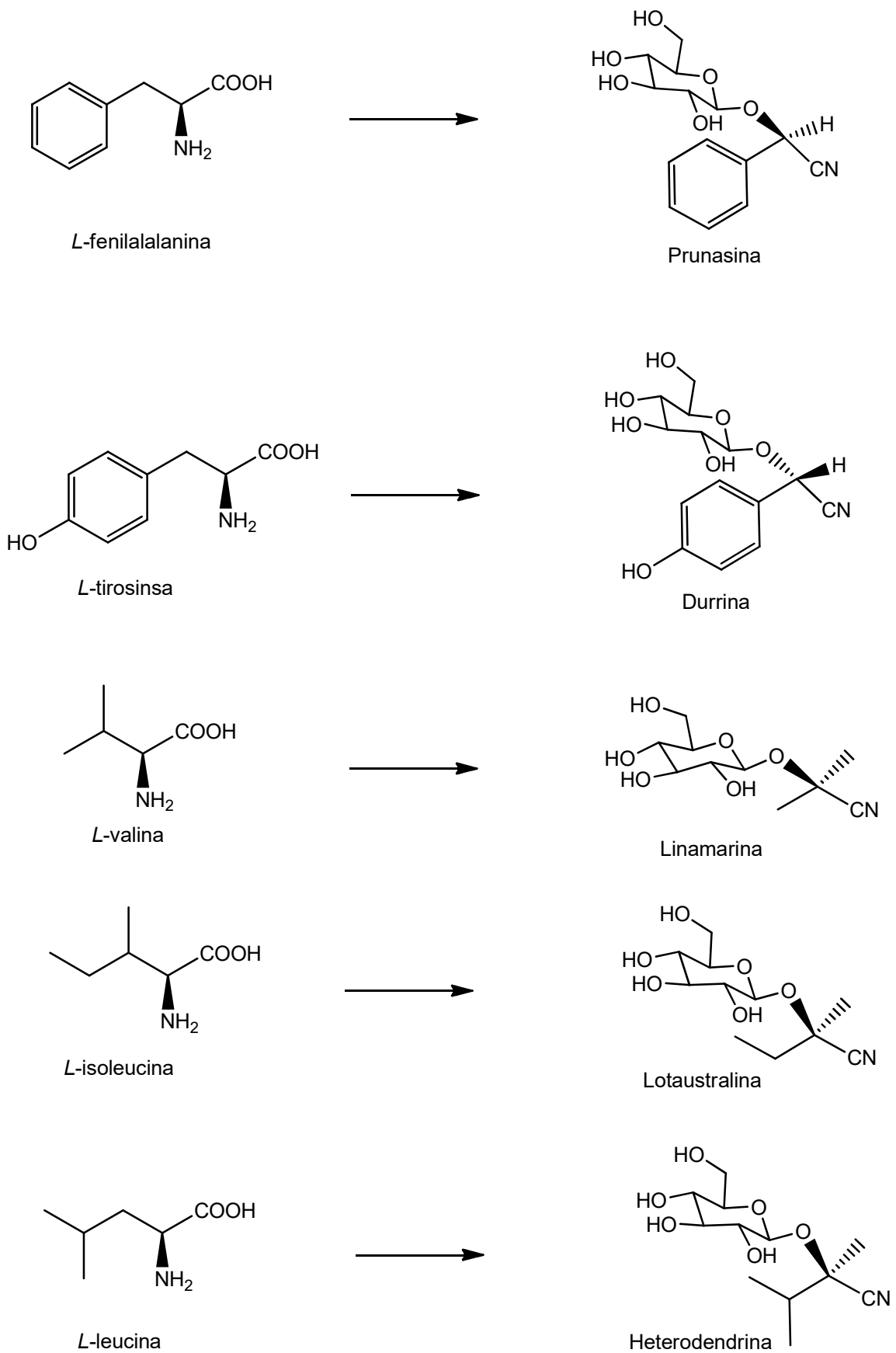


Figura 1. Estruturas de glicosídeos cianogênicos e seus precursores biossintéticos.

Os glicosinolatos, por sua vez, são compostos glicosilados presentes principalmente em plantas da família Brassicaceae, sendo estes, responsáveis pelo cheiro e gosto dos legumes (rabanete e repolho) (Figura 2). Assim como os glicosídeos cianogênicos, quando o tecido da planta é danificado, os glicosinolatos são hidrolizados por via enzimática, gerando compostos potencialmente tóxicos capazes de causar deterrência aos herbívoros (DEWICK, 2009).

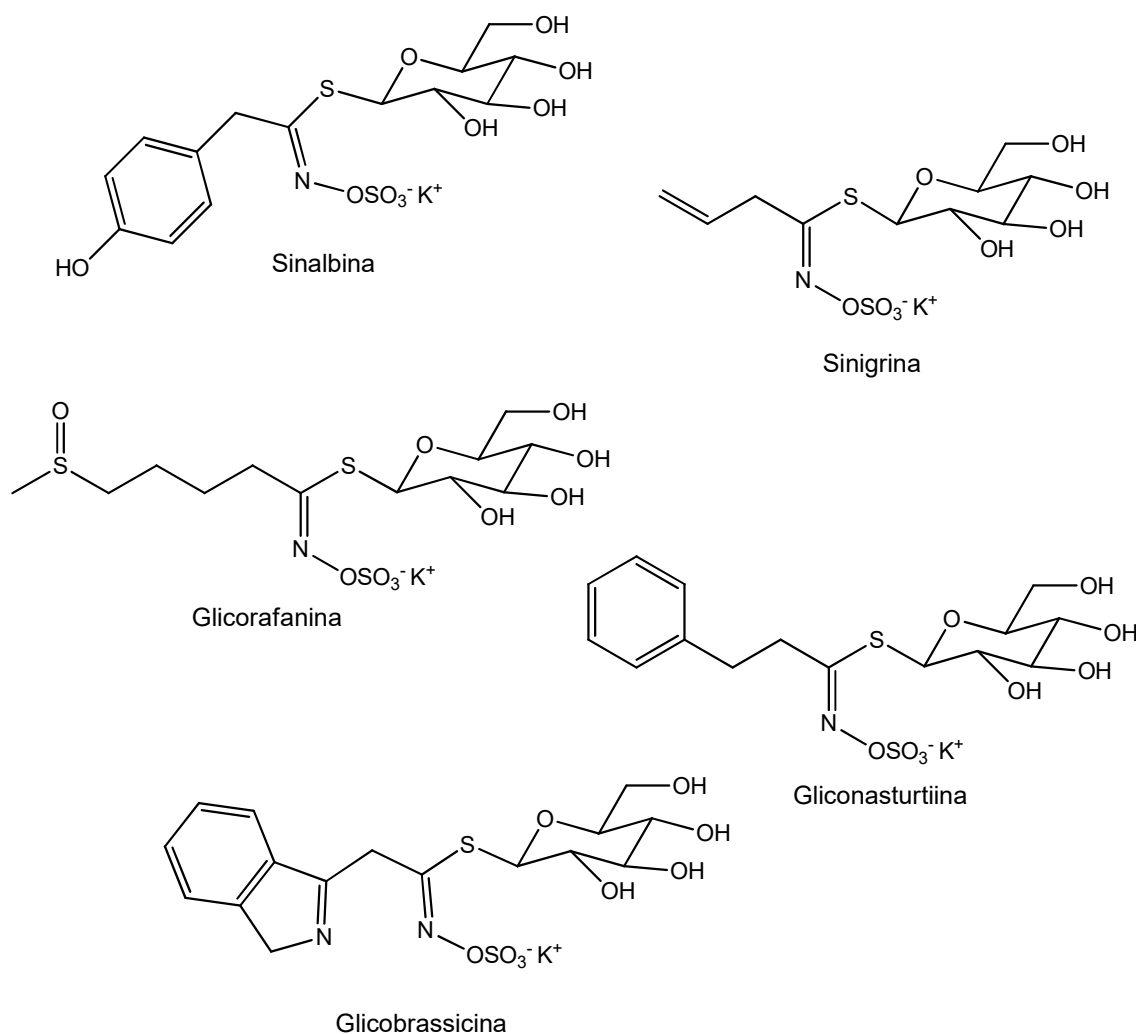


Figura 2. Estruturas de glicosinolatos.

1.3 Lepidópteros

Lepidoptera é a segunda ordem com maior número de espécies de insetos, pois possui cerca de 160.000 espécies catalogadas. Esta ordem compreende borboletas e mariposas, que são considerados os mais belos dentre os insetos, devido ao padrão peculiar da coloração de suas asas (HERRERA e PELLMYR, 2002; NISHIDA, 2002). As larvas dos lepidópteros apresentam uma forte relação com as plantas e sua maioria são fitófagas, sendo as plantas consideradas sua única fonte nutricional.

O ciclo de vida dos lepidópteros corresponde a três fases: larva, pupa (crisálida) e adulto. Na fase larval, estes insetos apresentam o trato digestivo composto por três regiões principais intestinos anterior, médio e posterior (LEVY *et al.*, 2004). A digestão do alimento e absorção de nutrientes ocorre no intestino médio, que apresenta grande parte das enzimas responsáveis pelo metabolismo, transporte e acúmulo de compostos tóxicos de plantas hospedeiras (HEIDEL-FISCHER; VOGEL, 2015; KUMAR *et al.*, 2014; LEVY *et al.*, 2004; MCLEAN e DUNCAN, 2006; STRAUSS *et al.*, 2013).

Há relatos na literatura de larvas de lepidópteros apresentando especificidade com plantas hospedeiras que produzem compostos secundários com propriedades aleloquímicas e tóxicas como alcaloides pirrolizidínicos, fenilpropanoides, glicosídeos cianogênicos, glicosinolatos, cardenolídeos, entre outros (HARTMANN e OBER, 2000; ZAGROBELNY *et al.*, 2014).

A especificidade de lepidópteros a plantas hospedeiras, que apresentam compostos de defesa com alta toxicidade, é associada pela função nutricional que a planta propicia ao inseto devido à presença de metabólitos primários nitrogenados como aminoácidos e proteínas necessários ao desenvolvimento dos organismos (NISHIDA, 2014; RASMANN; NADIR ALVAREZ; PELLISSIER, 2014; WÖLL *et al.*, 2013). Os compostos secundários associados à defesa química de plantas hospedeiras podem perder sua propriedade aleloquímica ao sofrerem biotransformações durante o metabolismo em insetos. Insetos herbívoros também podem sequestrar compostos de plantas e acumular em seus tecidos, usando-os como defesa química contra predadores. Como exemplo, temos as larvas de *Estigmene acrea* especialistas no sequestro de alcaloides pirrolizidínicos em espécies de plantas das famílias Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae, Apocinaceae e Orchidaceae (HARTMANN *et al.*, 2005).

1.4 Adaptação de insetos a defesa química das plantas

A adaptação de insetos herbívoros à plantas que acumulam compostos tóxicos ocorre pela capacidade destes, de inibir ou desativar a toxicidade dos compostos por processos enzimáticos. As reações enzimáticas podem promover modificações químicas em xenobióticos que, por sua vez, podem ocasionar a redução da toxicidade destes compostos, através da funcionalização ou pela glicosilação de compostos lipofílicos sendo realizadas por dois grupos de enzimas Citocromo P450 e UDP-glicosiltransferase, respectivamente (GLENDINNING, 2002; HEIDEL-FISCHER; VOGEL, 2015; MCLEAN e DUNCAN, 2006; WÖLL *et al.*, 2013).

1.4.1 Enzimas de desintoxicação para insetos

A superfamília de enzimas conhecidas como citocromo P450 monoxigenases estão presentes também em vegetais, participando da biossíntese de compostos secundários com funções de defesa química contra herbívoros e patógenos (MCLEAN e DUNCAN, 2006; WÖLL *et al.*, 2013). A desintoxicação de compostos nocivos em insetos ocorre através de reações enzimáticas como *N* ou *S*-oxidação, hidroxilação, epoxidação, e hexafluorofosfato de *O*, *N* ou *S*- desalquilação, gerando compostos menos tóxicos e mais polares, facilitando sua eliminação (BERGÉ; FEYEREISEN; AMICHOT, 1998; KUMAR *et al.*, 2014). A Citocromo P450 é crucial para a adaptação dos insetos a defesa química de plantas hospedeiras (HEIDEL-FISCHER e VOGEL, 2015; MCLEAN e DUNCAN, 2006; SCHULER; BERENBAUM, 2013; WÖLL *et al.*, 2013).

Os glicosídeos cianogênicos são compostos secundários distribuídos em mais de 2.500 espécies de plantas, incluindo angiospermas, gimnospermas e samambaias, responsáveis pela defesa química contra herbívoros (VETTER, 2000; ZAGROBELNY *et al.*, 2004). Estes compostos não são tóxicos, mas ao sofrerem reação de hidrólise, libera um gás bastante tóxico, o ácido cianídrico.

A hidrólise dos glicosídeos cianogênicos ocorre quando o tecido da planta é danificado por insetos (VETTER, 2000) (Figura 3).

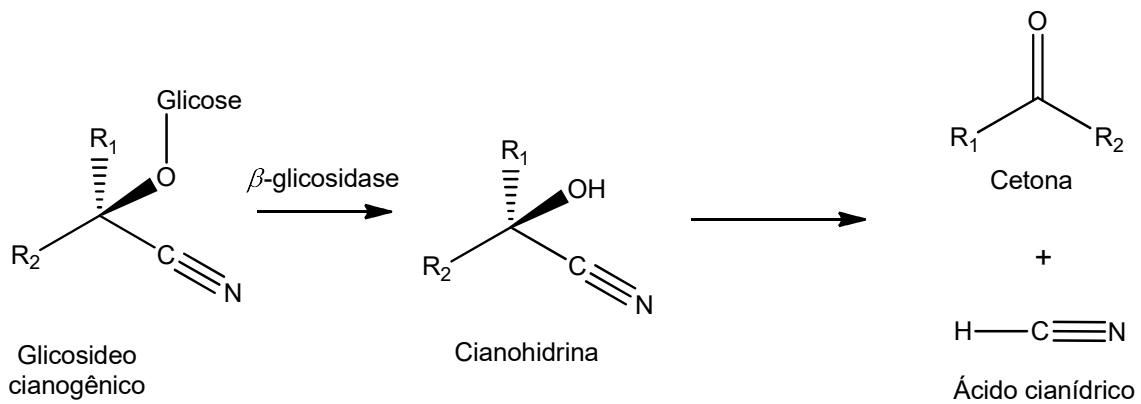


Figura 3. Hidrólise enzimática de glicosídeos cianogênicos.

Algumas larvas de lepidópteras são totalmente adaptadas a dietas de folhas ricas em glicosídeos cianogênicos, por exemplo: as larvas de *Heliconius sara* apresentam dieta exclusiva das folhas de *Passiflora auriculata* que apresentam altas concentrações do glicosídeo cianogênico epivolkenina. Este xenobiótico é metabolizado pelas larvas de *H. Sara*, e excretado na sua forma atóxica para a larva. O composto é atóxico devido a substituição do grupo nitrila por um grupo tiol (ENGLER; SPENCER; GILBERT, 2000) (Figura 4). Este mecanismo de desintoxicação de glicosídeos cianogênicos realizado por *H. sara* não tem sido observado em outros organismos.

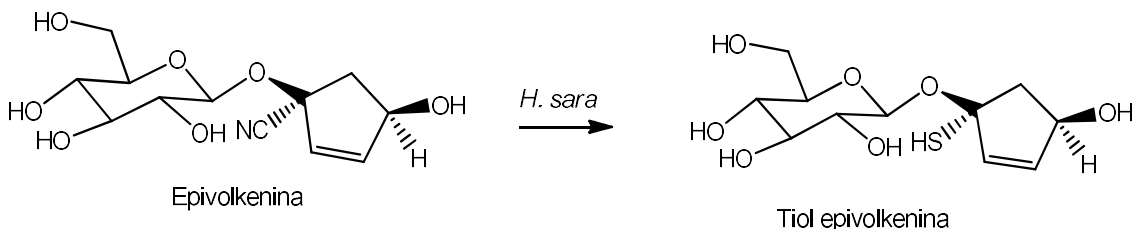


Figura 4. Metabolismo da epivolkenina em tiol epivolkenina pela lagarta *H. sara*.

Os mecanismos conhecidos para desintoxicação do HCN em plantas, insetos e animais é realizado por no mínimo dois mecanismos. O primeiro mecanismo envolve a formação da β -cianoalanina, a partir da cisteína,

catalisada pela enzima β -cianoalanina-sintase, a β -cianoalanina é convertida em asparagina. O segundo mecanismo envolve a conversão do HCN em tiocianato, sendo esta, catalisada pela enzima *rodanese*. O mecanismo de desintoxicação através da formação da β -cianoalanina é mais frequente em insetos, enquanto a rota via tiocianato é mais comum em vertebrados, ocorrendo também em algumas espécies de plantas e insetos (ZAGROBELNY *et al.*, 2004) (Figura 5).

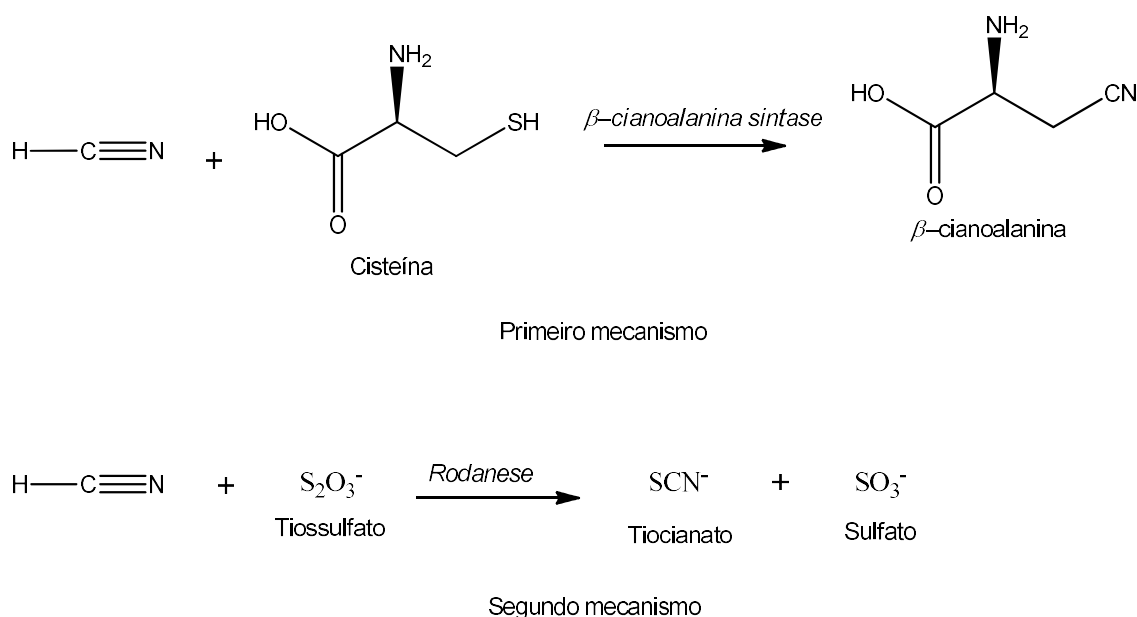


Figura 5. Mecanismos de desintoxicação do HCN.

Os alcaloides pirrolizidínicos são encontrados em angiospermas das famílias Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae, Apocinaceae e Orchidaceae, podendo estar presentes na forma de uma base livre (tóxica) e na forma de *N*-óxido (não tóxica) (HARTMANN *et al.*, 2005; HARTMANN e OBER, 2000). Nas plantas, os alcaloides pirrolizidínicos são biossintetizados e armazenados na forma de *N*-óxido, que facilita a distribuição destes pelo vegetal (HARTMANN, 2004; HARTMANN e OBER, 2000). Em herbívoros não adaptados, a forma *N*-óxido é rapidamente reduzida para a forma básica, tóxica, nos intestinos dos mesmos (HARTMANN e OBER, 2000).

Para insetos adaptados, como as espécies de lepidópteros *Tyria jacobaeae* e *Estigmene acrea* que biotransformam a forma tóxica dos alcaloides pirrolizidínicos na forma não tóxica *N*-óxido, através de uma redução

enzimática por senecionina *N*-oxigenase, após a absorção no trato digestivo. A forma não tóxica é armazenada nos tecidos do inseto para ser utilizada como mecanismo de defesa contra predadores (HARTMANN *et al.*, 2005; HARTMANN e OBER, 2000) (Figura 6).

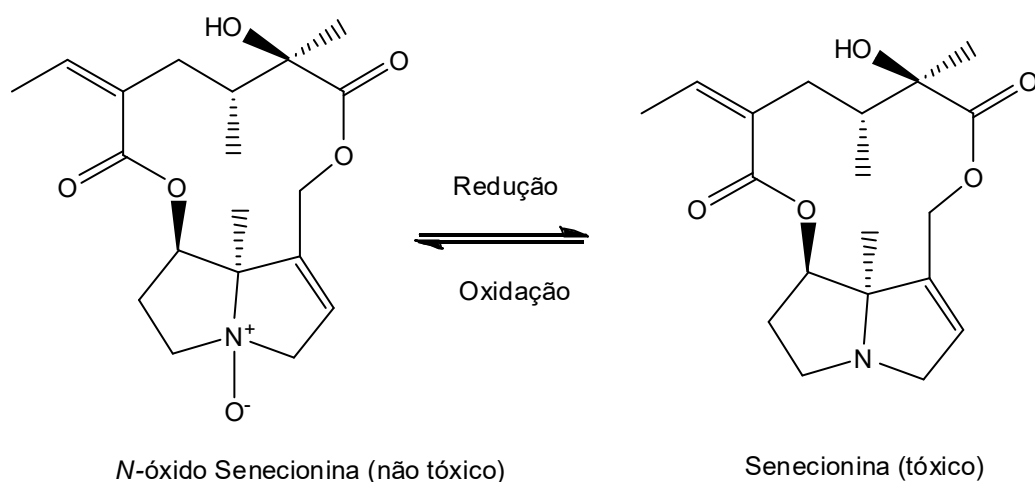


Figura 6. Formas tóxicas e não tóxica da senecionina encontrados na natureza.

Além dos compostos citados anteriormente, os terpenoides compõe uma classe de compostos secundários responsáveis pela fragância de uma planta e são considerados como fonte de compostos bioativos, tendo aplicabilidade no controle de pragas agrícolas (BADREDDINE *et al.*, 2015; PASSREITER *et al.*, 2004; RIBEIRO; CAMARA; RAMOS, 2016). Estudos realizados com larvas de *Spodoptera litura* (Noctuidae) relatam a biotransformação da (+)-(1*R*) e (-)-(1*S*)-cânfora, constituintes majoritários do óleo essencial de *Cinnamomum camphora*, em seis terpenoides por meio da hidroxilação regio e estereoseletiva. No estudo, verificou-se que a (+)-(1*R*)-cânfora foi biotransformada em três terpenoides: (+)-(1*R*, 5*S*)-5-endo-hidroxicanfóra, (+)-(1*R*, 5*R*)-5-exo-hidroxicanfóra e (+)-(1*R*, 7*R*)-8-hidroxicanfóra. A biotransformação de (-)-(1*S*)-cânfora produziu três terpenoides, sendo eles enantiômeros dos produtos biotransformados de (+)-(1*R*)-cânfora (MIYAZAWA e MIYAMOTO, 2004) (Figura 7).

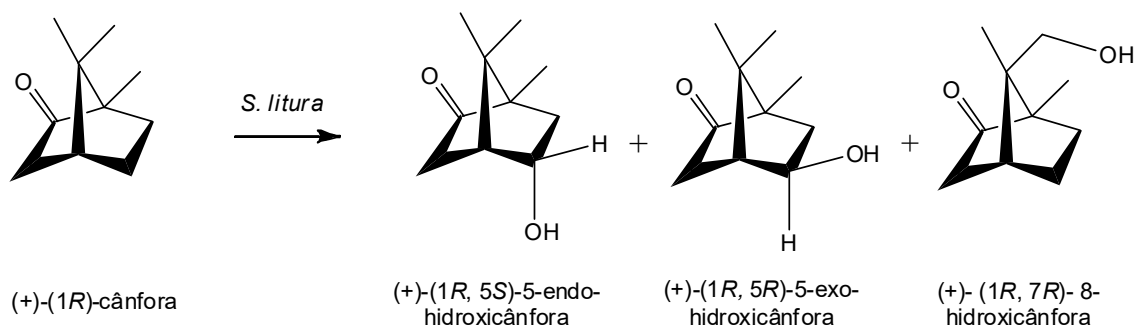


Figura 7. Biotransformação da (+)-(1R)-cânfora por *S. litura*.

Outros compostos são as furanocumarinas, compostos secundários encontrados em várias famílias de plantas. Esta classe apresenta alta toxicidade por interagir covalentemente com o DNA, proteínas e lípidos de vírus, bactérias, insetos e demais seres vivos (PETERSEN *et al.*, 2001). Apesar disso, larvas *Spodoptera frugiperda* tornaram-se especialistas na dieta de plantas contendo furanocumarinas. Como é o caso do metabolismo da xantotoxina, uma furanocumarina presente em *Papilio polyxenes*, que é biotransformada por larvas *S. frugiperda* em dois metabólitos através da clivagem do anel furano (IVIE *et al.*, 1983) (Figura 8).

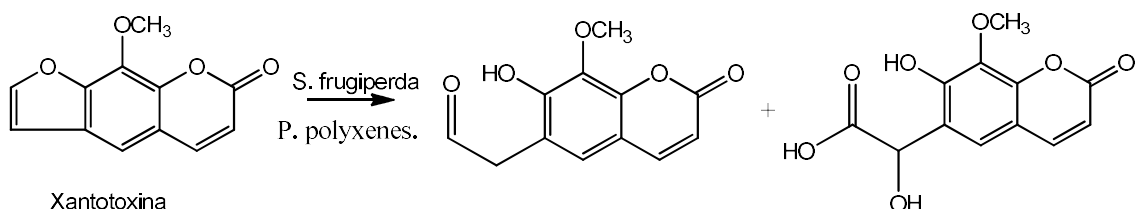


Figura 8. Biotransformação de Xantotoxina por *S. frugiperda* e *P. polyxenes*.

1.4.2 Glicosilação

A conjugação de compostos lipofílicos a carboidratos é catalisada pelas enzimas UDP-glicosiltransferases (UGTs) sendo um mecanismo de desintoxicação de extrema importância para insetos, pois torna compostos tóxicos e lipofílicos, solúveis em água, o que facilita sua excreção (AHN; VOGEL HECKEL, 2012; HEIDEL-FISCHER e VOGEL, 2015; MCLEAN e DUNCAN, 2006; WÖLL *et al.*, 2013). Nos insetos, a atividade das UGTs é

encontrada no intestino, hemolinfa e demais tecidos (AHN; VOGEL; HECKEL, 2012). Sabendo disso, alguns exemplos de mecanismos de desintoxicação através da glicosilação por meio de enzimas UGTs são descritos abaixo.

As 4-benzoxazin-3-ona são metabólitos que contêm nitrogênio e derivam do fosfato de indol-3-glicerol. Estas são encontradas no milho, trigo e centeio. Após a sua biossíntese, elas são armazenadas na forma de glicosídeos não ativos no vacúolo (MACÍAS *et al.*, 2009). Quando o tecido do vegetal é danificado pela ação de um herbívoro, o glicosídeo é hidrolisado liberando a sua aglicona tóxica (MORANT *et al.*, 2008). No entanto, o lepidóptero *Spodoptera frugiperda* consegue metabolizar o 6-metoxi-2-benzoxazolinona, presente no milho, em seu derivado não tóxico, o glicosídeo 6-metoxi-2-benzoxazolinona 3- β -D-glicopiranosídeo (MAAG *et al.*, 2014) (Figura 9).

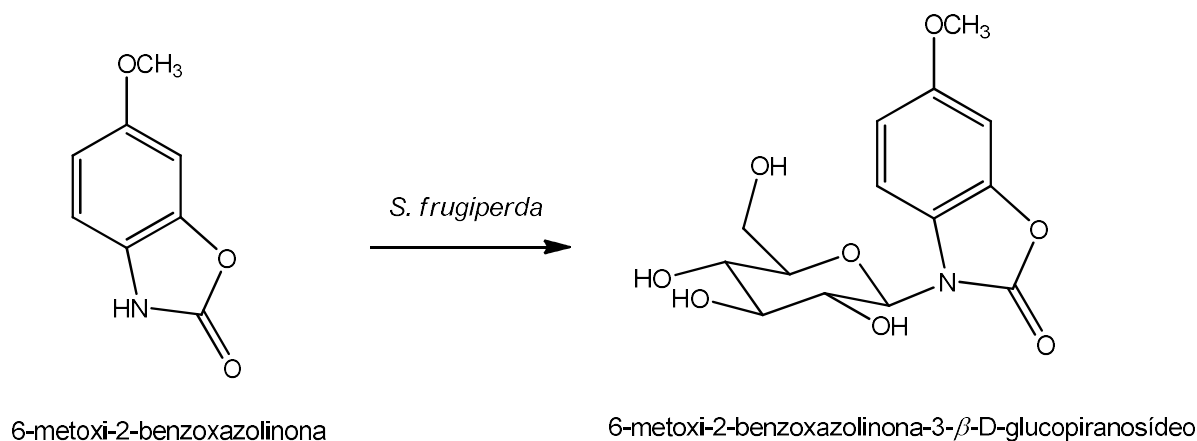


Figura 9. Metabolismo da 6-metoxi-2-benzoxazolinona por *S. frugiperda*.

O gênero *Capsicum* produz os capsaicinoides, que são responsáveis pela sensação de ardência em mamíferos, sendo a capsaicina a substância mais encontrada em abundância nos frutos de espécies deste gênero. Estudos realizados com insetos usando a capsaicina apresentaram deterrência alimentar contra o besouro *Henosepilachna vigintioctomaculatae* e atividade larvívora contra duas espécies de mosquitos *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus* (HORI *et al.*, 2011; MADHUMATHY; AIVAZI; VIJAYAN, 2007). Apesar de suas propriedades aleloquímicas, espécimes de *Capsicum annum* são danificados por larvas *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera), sendo a larva completamente adaptada a dieta rica em capsaicina (AHN; BADENES-PÉREZ;

HECKEL, 2011). Estudos realizados por AHN e colaboradores (2011) revelaram que *H. assulta* excreta a capsaicina na forma de um derivado glicosídico o capsaicina β -D-glicopiranosídeo (Figura 10).

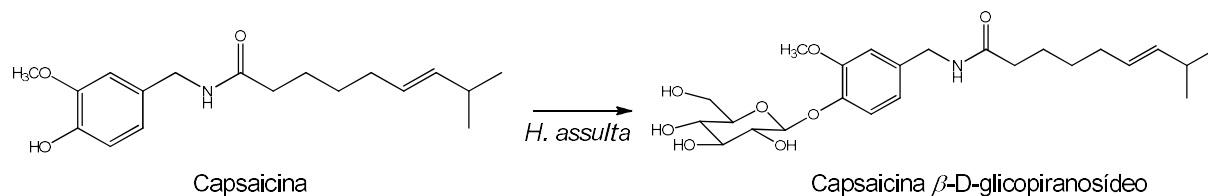


Figura 10. Metabolismo da capsaicina por *H. assulta*.

Os compostos fenólicos também fazem parte da defesa química das plantas contra o ataque de insetos herbívoros (ONYILAGHA *et al.*, 2012; SALMINEN *et al.*, 2004; SELIN-RANI *et al.*, 2016). Dentre as classes que constituem os compostos fenólicos, temos os flavonóides largamente distribuídos em plantas. Estes são encontrados principalmente em frutas, flores e legumes (HUANG *et al.*, 2015). A quercetina é um flavonóide muito abundante nos vegetais e apresenta diversas atividades biológicas, dentre elas, atividade larvicida contra ao lepidóptero *S. litura* (SELIN-RANI *et al.*, 2016). Além disso, sua forma glicosilada mostra deterrência alimentar ao besouro *Phyllotreta cruciferae* (ONYILAGHA *et al.*, 2012).

As larvas do bicho-de-seda (*Bombyx mori*, Lepidoptera), quando submetidas a dieta artificial rica em quercetina, é capaz de biotransformá-la em dois derivados: a quercetina 5- β -D-glicopiranosídeo e quercetina 5,4-di- β -D-glicopiranosídeo (HIRAYAMA *et al.*, 2008). O composto quercetina 5- β -glicopiranosídeo é encontrado predominantemente no intestino do inseto, enquanto a quercetina 5,4- β -D-diglicopiranosídeo é encontrada apenas na hemolinfa do inseto, indicando que a glicosilação na posição cinco é a primeira etapa para que ocorra a glicosilação na posição 4, indicando uma regioseletividade na biotransformação na quercetina (HIRAYAMA *et al.*, 2008) (Figura 11).

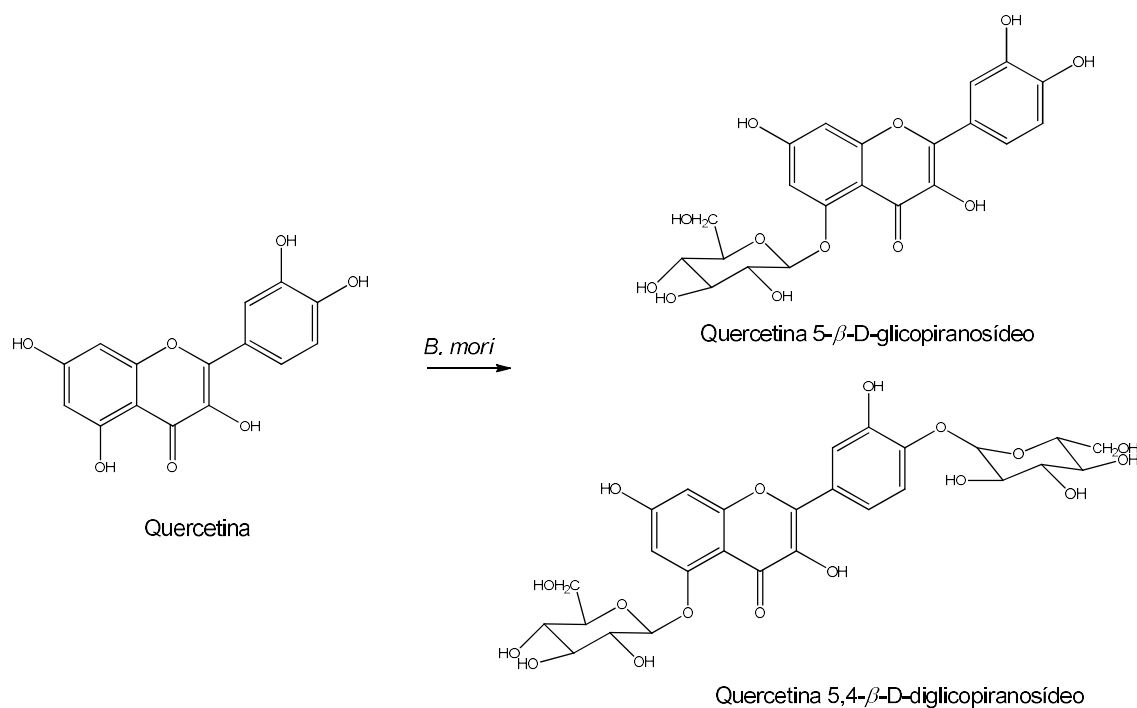


Figura 11. Metabolismo da quecertina por *B. mori*.

Outro relato de glicosilação do monoterpeneo timol, principal constituinte do óleo essencial do tomilho (*Thymus vulgaris*), ocorre por larvas de pragas agrícolas de *S. litura* e *Trichoplusia ni*. O efeito sinérgico deste composto é estudado como um controle de pragas para ambos os insetos. Estes foram submetidos a uma dieta artificial, quando foi observado que o timol era biotransformado em timol 3-β-D-glicopiranosídeo por ambos *S. litura* e *T. ni* (PASSREITER *et al.*, 2004) (Figura 12).

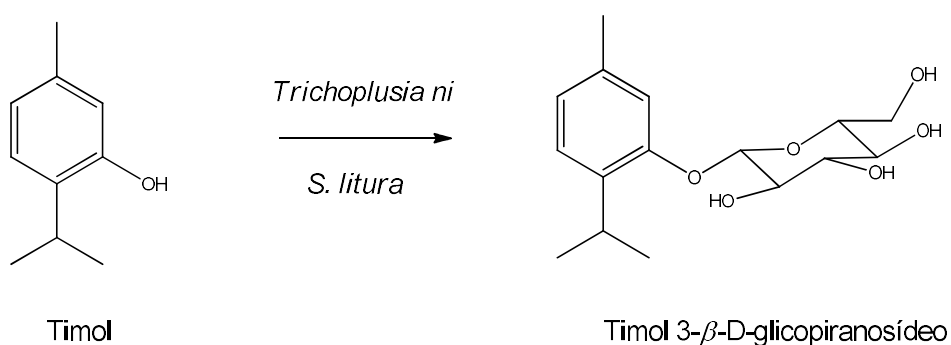


Figura 12. Metabolismo do timol por *S. litura* e *T. ni*.

1.4.3 Sequestro de compostos de defesa

Além dos mecanismos de desintoxicação, insetos especialistas podem sequestrar e acumular em seus tecidos, metabólitos secundários de plantas com propriedades de semioquímicos, usando-os como defesa química. Há relatos na literatura do sequestro de classes metabólicas como amidas, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, iridoides, saliciloides e glicosinolatos, por insetos de ordens distintas como Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera (GREENEY; DYER; SMILANICH, 2012; PENTZOLD *et al.*, 2014; ZAGROBELNY *et al.*, 2014; BOLAND, 2015; HEIDEL-FISCHER; VOGEL, 2015; PETSCHENKA; AGRAWAL, 2016; PINTO *et al.*, 2016).

Atualmente, relatos pertinentes apresentam dados de sequestro e acúmulo dos glicosídeos cianogênicos por insetos sem que ocorra a hidrólise e liberação de ácido cianídrico (PENTZOLD *et al.*, 2014). Como, por exemplo, a larva de *Zygaena filipendulae* que se alimenta das folhas de *Lotus corniculatus* (Fabaceae), que contém os glicosídeos cianogênicos linamarina e lotaustralina associado à defesa química da planta. Estes são sequestrados e acumulados nos tecidos sem nenhuma alteração em sua estrutura química. O sucesso de *Z. filipendulae* deve-se a duas adaptações morfológicas: o aparelho bucal do inseto, que corta fragmentos da folhas sem danificar as células do tecido vegetal e; o pH alcalino do intestino, que inibe a ação enzimática da β -glicosidase presente na planta, responsável pela hidrólise dos glicosídeos cianogênicos (PENTZOLD *et al.*, 2014).

Os compostos secundários sequestrados são translocados de forma eficiente por uma bomba de multicomponentes, que contém enzimas transportadoras e catalíticas (ERB e ROBERT, 2016; STRAUSS *et al.*, 2013; WÖLL *et al.*, 2013; ZAGROBELNY *et al.*, 2014). Um exemplo deste mecanismo ocorre na larva do besouro *Chrysomela Populi*, onde ocorre o sequestro do salicina pela enzima transportadora CpMRP da família ABC (*ATP binding cassette transporter*), da larva do besouro *Chrysomela populi* e seu posterior armazenamento na hemolinfa do inseto (STRAUSS *et al.*, 2013). Processo semelhante é encontrado no lepidóptero *Manduca sexta*, que utiliza a enzima CYP6B46, responsável por converter a nicotina em um intermediário de curta duração e de fácil acoplamento, por enzimas transportadoras, sendo levada do

intestino médio à hemolinfa deste inseto. Na hemolinfa o intermediário é convertido para nicotina (KUMAR *et al.*, 2014).

Os metabólitos sequestrados podem ser utilizados pelos insetos como defesa química contra predadores, parasitas e parasitóides (GREENEY; LA DYER; AM SMILANICH, 2012; LEE A DYER, 1996). As folhas de *Nicotiana attenuata* foram adicionadas a dieta da lagarta *M. sexta* e foi observado que a nicotina, composto alcaloide abundante na planta com potente atividade inseticida, não sofre biotransformação durante o processo digestivo da lagarta. Este estudo também mostrou que a lagarta sequestra e acumula, em seus tecidos, a nicotina, na concentração de 0,65%. Além disso, o estudo indicou que a lagarta *M. sexta*, na presença da aranha *Camptocosa parallela*, sua predadora natural, exala nicotina através dos espiráculos, agindo como fago-inibidora para aranha, inibindo assim a ação do predador (KUMAR *et al.*, 2014).

O acúmulo de altas concentrações dos compostos sequestrados pode causar efeitos negativos aos insetos, tornando-os mais susceptíveis a parasitóides (CRONIN; ABRAHAMSON, 2001; LAMPERT; DYER; BOWERS, 2010; RICHARDS *et al.*, 2010). Por exemplo, um estudo realizado por Zvereva e Rank (2003) observou que larvas do besouro *Chrysomela lapponica* sequestram do salicina, presentes em espécies de salgueiro. Além disso, verificaram que havia maior taxa de parasitismo quando realizada dieta com altas concentrações deste glicosídeo ao compara-se com dieta de baixa concentração da salicina.

Embora estudos tenham observado o sequestro e biotransformações de compostos presentes em diversas famílias de plantas por espécies da ordem Lepidoptera, ainda são escassos estudos que relatem a metabolização e sequestro de compostos em espécies da família Piperaceae. Sabendo que a família Piperaceae possui potente atividade inseticida, faz-se necessária a investigação da interação planta-inseto entre espécies da família Piperaceae e espécies da Ordem Lepidoptera.

1.5 Família Piperaceae

A família Piperaceae está entre as mais primitivas angiospermas, sendo considerado um fóssil vegetal vivo (TAYLOR; HICKEY, 1992). As espécies de Piperaceae podem ser arbustos eretos ou escandentes, pequenas árvores ou ervas suculentas, terrestres ou epífitas, com hastes geralmente mais ou menos nodosas (GUIMARÃES e CARVALHO-SILVA, 2009; MONTEIRO e GUIMARÃES, 2009). A maioria das espécies desta família produz frutos do tipo espigas (Figura 13) com grande quantidade de sementes. Estas possuem síndrome de dispersão zoocórica, sendo frequentemente a dispersa por morcegos (FLEMING, 1981).



Figura 13. Plantas da família Piperaceae e seus frutos.

A família Piperaceae é uma das maiores dentre as angiospermas basais, tendo uma grande variedade de espécies localizada nas Américas Central e do Sul, com cerca de aproximadamente 3.600 espécies (SMITH *et al.*, 2008). Esta família é constituída por cinco gêneros sendo eles, *Manekia*, *Verhuellia*, *Zippelia*, *Peperomia* e *Piper*. Os gêneros *Piper* e *Peperomia* juntos contém mais de 3000 espécies de plantas (GUTIERREZ *et al.*, 2016). No Brasil, existe uma alta ocorrência de espécies de Piperaceae, com cerca de 500 distribuídas na Floresta Amazônica e Mata Atlântica. Estas são pertencentes aos gêneros

Piper, *Peperomia* e *Manekia* (JARAMILLO e MANOS, 2001; MONTEIRO e GUIMARÃES, 2009).

Os gêneros *Piper* e *Peperomia* são os mais estudados com relação à química e seu potencial biológico, sendo utilizados na medicina popular, na ornamentação e como condimentos (GUTIERREZ *et al.*, 2016; PARMAR *et al.*, 1997).

1.6 *Piper*

O gênero *Piper* encontra-se distribuído nas regiões tropicais e subtropicais. É composto por aproximadamente 1.500 espécies de plantas (SMITH *et al.*, 2008). No Brasil, as espécies de *Piper* são encontradas, em sua maioria, em florestas úmidas como Amazônica e Mata Atlântica (MONTEIRO, 2013). Espécies do gênero *Piper* são utilizadas como plantas medicinais, na cultura popular e apresentam um valor comercial, como especiarias.

Bons exemplos de espécies do gênero *Piper* são a pimenta branca e a pimenta preta, ambas originárias dos frutos da *Piper nigrum*. Além destas, as raízes de *P. methysticum* (kava-kava) são utilizadas para produzir uma bebida alucinógena por povos das ilhas do Pacífico (JEONG *et al.*, 2015; PARMAR *et al.*, 1997).

Espécies de Piperaceae têm sido amplamente usadas por populações chinesa, indiana e nativos americanos, no tratamento de enfermidades, como, bronquite (*P. arboreum* e *P. guinunse*), doenças venéreas, gastrointestinais, reumatismo (*P. guinunse* e *P. arboreum*), asma (*P. chaba* e *P. futokatsura*), estimulante, dor abdominal (*P. chaba*), dor de estômago, repelente (*P. aduncum* e *P. hispidum*), anti-inflamatório, antídoto para picada de cobra (*P. amalago*), chá para gripes e resfriados (*P. arboreum*), tratamento da insônia (*P. methysticum*), entre outros usos (JEONG *et al.*, 2015; RAMOS e KATO, 2009; RAO *et al.*, 2011; VANIN *et al.*, 2008; PARMAR *et al.*, 1997).

Há um contraste muito grande entre o número de espécies pertencentes a este gênero e as investigações fitoquímicas realizadas sobre o mesmo. Apenas 12% destas foram estudadas, sendo revelada uma grande variedade de metabólitos secundários como alcaloides, amidas, fenilpropanoides,

lignanas, neolignanas, flavonas, flavononas, cromenos, terpenos, chalconona e kavapirona (PARMAR *et al.*, 1997) (Figura14).

A grande variedade de classes de compostos secundários confere grande diversidade de atividades biológicas como, por exemplo, atividade antileishmanicida (DAL PICOLO *et al.*, 2014), anticâncer (MESSIANO *et al.*, 2013), antifúngica (RAMIREZ *et al.*, 2013), acaricida (PARK *et al.*, 2002), antibacteriana (REZENDE *et al.*, 2016), larvicida (AUTRAN *et al.*, 2009), antileucêmica (BEZERRA *et al.*, 2007), antioxidante (LUYEN *et al.*, 2014), antituberculose (CHEN *et al.*, 2013), antiplaquetária (FONTENELE *et al.*, 2009), antidepressivo, ansiolítico (BEZERRA *et al.*, 2007) antiparasitário (FLORES *et al.*, 2009) e tripanocida (REGASINI *et al.*, 2009). Mesmo com outras atividades em potencial, a atividade inseticida é a mais relatada para espécies do gênero *Piper* (PARK *et al.*, 2002; (MIRANDA *et al.*, 2002); ESTRELA *et al.*, 2003; FAZOLIN *et al.*, 2005; FAZOLIN *et al.*, 2007).

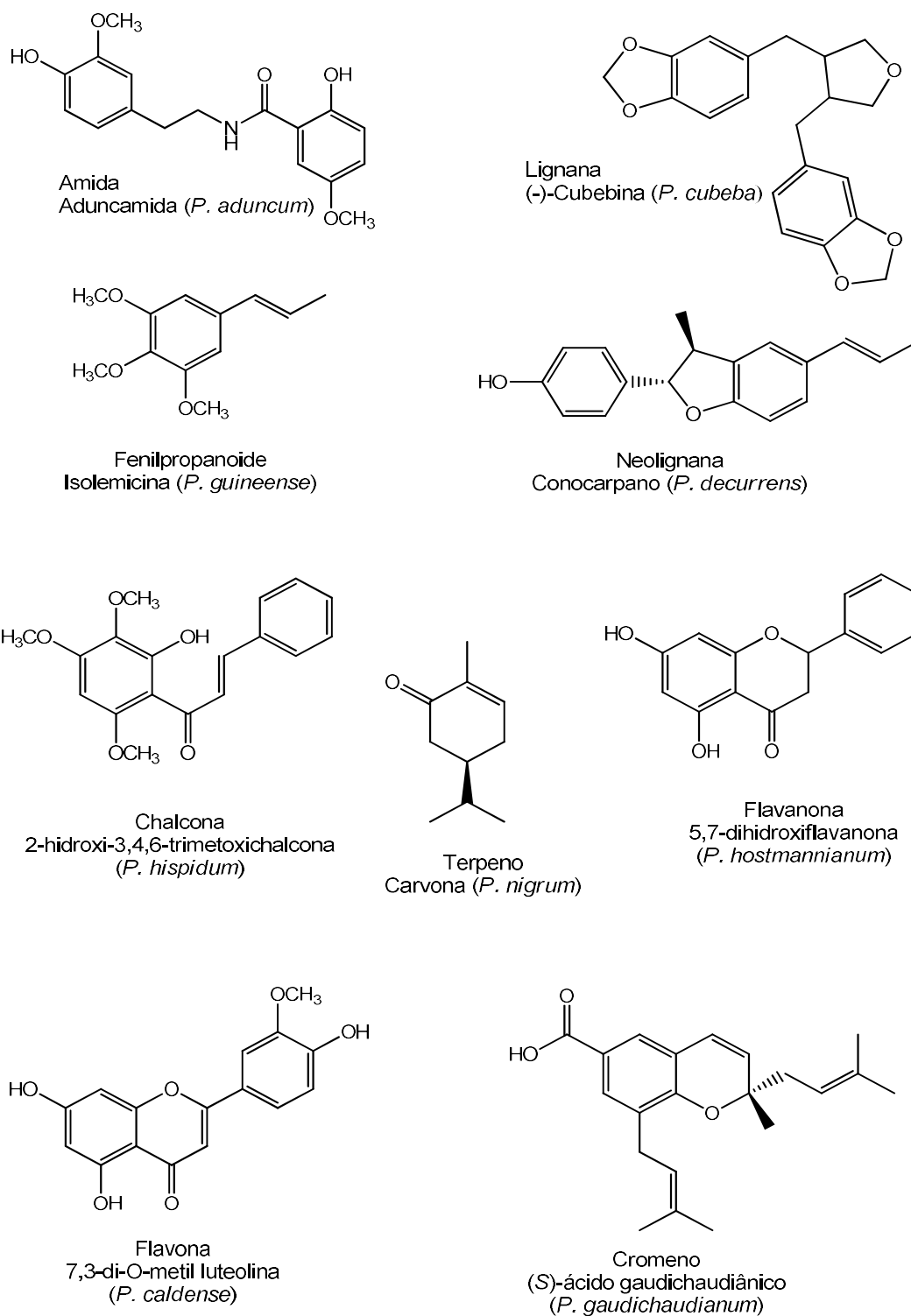


Figura 14. Variedade de classes de metabólitos secundários encontradas em espécies de *Piper*.

Dentre as classes de compostos secundários biossintetizados e utilizados por estas plantas com uma função de defesa química contra os insetos, existem lignanas, fenilpropanoídes, amidas e ácidos benzóicos prenilados. Diversos estudos têm analisado compostos e suas potenciais

atividades biológicas. O safrol, fenilpropanoide presente nas folhas de *P. hispidinervum* e *P. divaricatum* com composição de 90% do óleo essencial, apresentou atividade inseticida contra *S. frugiperda* (LIMA *et al.*, 2009). O ácido benzóico prenilado, identificado nas folhas de *P. Kelleyi* como ácido 3-geranil-4hidroxi-5-(3",3"-dimetilalil) benzóico, foi verificada atividade antiherbivoria para larvas da lagarta generalista *S. exigua*, aumentando o período da fase larval, o que diminui a fecundidade do inseto adulto (JEFFREY *et al.*, 2014). A lignana cubebina mostrou atividade de deterrência alimentar contra larvas de besouros das espécies *Sitophilus granarius*, *Tribolium confusum* e *Trogoderma granarium*, considerados pragas (HARMATHA & NAWROT, 2002). A amida piperina, obtidas de *P. nigrum* e análogos, mostraram-se tóxicas contra as larvas de lagartas *S. frugiperda* e *Ascia monuste orseis* (Figura 15) (ESTRELA *et al.*, 2003).

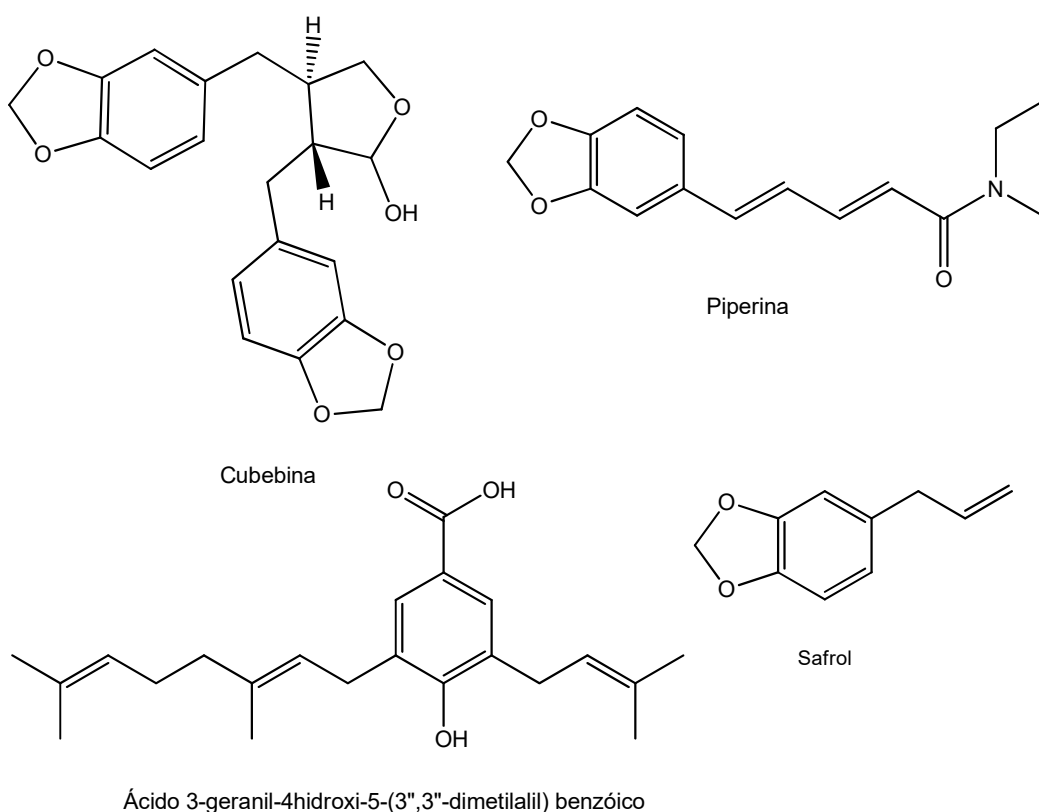


Figura 15. Metabólitos secundários de defesa química presentes em *Piper*

1.7 Interação entre espécies do gênero *Piper* e lepidópteros

Apesar do grande potencial inseticida apresentado por classes de compostos secundários como fenilpropanoides, lignanas, amidas e ácidos benzóico prenilados biossintetizados por espécies de *Piper*, a presença de insetos pertencentes às ordens Coleoptera, Hemiptera e Lepidoptera se alimentando de *Piper* são frequentes (VANIN *et al.*, 2008) mostrando que há especificidade química de lepidópteros por espécies que acumulam lignanas e neolignanas, enquanto insetos das ordens Coleoptera e Hemiptera por espécies de *Piper* que acumulam derivados prenilados do ácido benzóico.

Como parte do nosso estudo sistemático, nosso grupo de pesquisa tem avaliado o metabolismo de compostos secundários de espécies de *Piper* por insetos, relatando a biotransformação de compostos com potencial atividade inseticida de *Piper* (RAMOS *et al.*, 2012; RAMOS; BARBOSA; VANIN, 2014; RAMOS; VANIN; KATO, 2008).

Um dos compostos mais estudados, o safrol é um fenilpropanoide encontrado com teores maiores que 90% nas folhas, frutos e caule de *Piper divaricatum* (BARBOSA *et al.*, 2012). Este composto é largamente utilizado na indústria como agente flavorizante, como fragância em cosméticos e como sinérgico nos inseticidas e pesticidas naturais à base de Piretrum (BRAGA; CREMASCO; VALLE, 2005). O safrol é citado na literatura por apresentar potente atividade inseticida, apesar disso, a lagarta *Heraclides brasilienses* foi observada em campo se alimentando das folhas de *P. divaricatum*. Ramos e colaboradores (2014) observaram que este lepidóptero biotransforma o safrol em dois outros metabólitos, o eugenol (majoritário) e o metileugenol, através da clivagem da porção metilendioxi da molécula (Figura 16). Estudos com humanos e ratos revelaram que o safrol é metabolizado em allicatecol (majoritário) e eugenol (minoritário) (BENEDETTI; MALNOE; BROILLET, 1977).

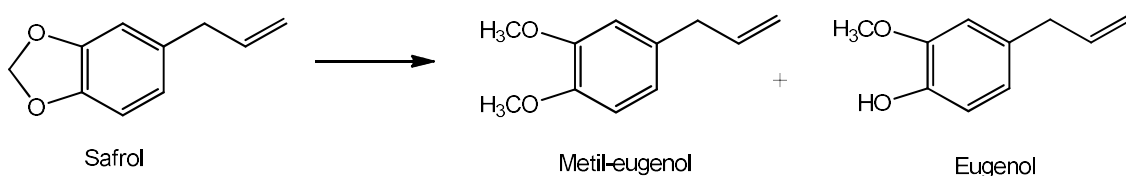


Figura 16. Derivados obtidos a partir do metabolismo do safrol por *H. brasilienses*.

As lignanas são metabólitos formados pela dimerização de moléculas de fenilpropanoides via acoplamento oxidativo. Estes compostos são descritos por apresentarem atividade inseticida, podendo estar envolvidos na defesa das plantas contra insetos herbívoros (HARMATHA; NAWROT, 2002). A (-)-grandisina, uma lignana tetraidrofurana, é o constituinte majoritário isolado das folhas de *P. somlsianum*, sendo relatada por apresentar atividade contra o protozoário *Trypanossoma cruzi*, responsável pela causa da doença de chagas, sendo considerada como um medicamento promissor no combate desta doença (MARTINS *et al.*, 2000).

Esta lignana também apresenta atividade larvicida promissora contra o *Aedes aegypti*, mosquito transmissor da dengue (CABRAL *et al.*, 2009). Pesquisas realizadas por Ramos e colaboradores (2008) revelaram que a larvas de *Quadrus u-lucida* e *H. brasilienses* se alimentam naturalmente das folhas de *P. solisianum*, e foi observado que a (-)-grandisina sofre biotransformação para seus respectivos fenóis mono-*O*-demetilado (a) e di-*O*-demetilado (b) (Figura 17). As reações de demetilação realizadas por estes insetos demonstram ser regioespecíficas na posição *para* em relação ao anel tetraidrofurano (RAMOS; VANIN; KATO, 2008).

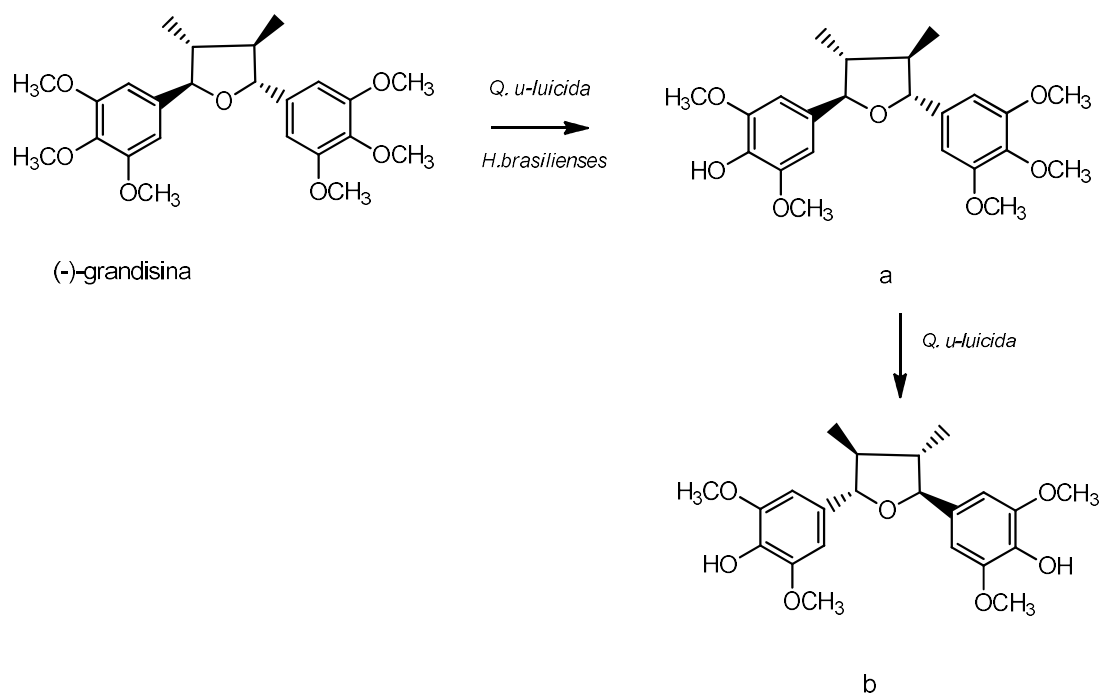


Figura 17. Metabolismo da (-)-grandisina pelas lagartas das borboletas *Quadrus u-lucida* e *H. brasilienses*.

Ramos e colaboradores (2012) observaram que a planta *P. umbellata* é hospedeira da lagarta *Heraclydes brasilienses*. As folhas desta planta apresentam como constituinte majoritário o 4-nerolidilcatecol, relatado com potente atividade anti-inflamatória, antioxidante e larvívica contra o *Aedes aegypti* (PINTO *et al.*, 2006). A lagarta *H. brasilienses* biotransforma o 4-nerolidilcatecol no derivado ácido o *E*-2,3-dihidro-3-(3,4-dihidroxifenil) farnesóico (RAMOS *et al.*, 2012) (Figura 18).

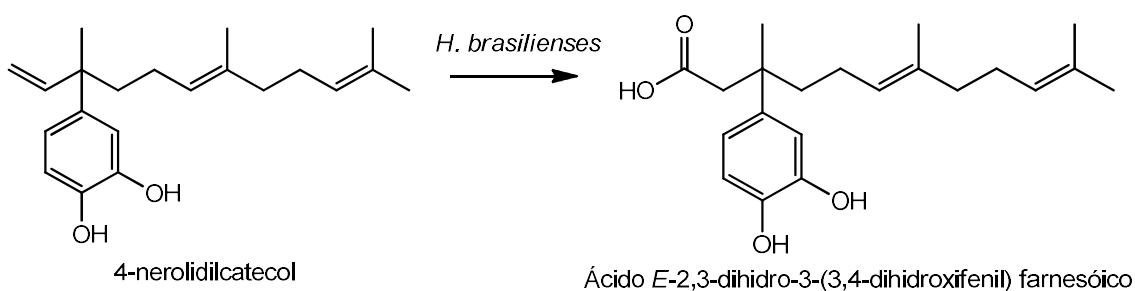


Figura 18. Metabolismo do 4-nerolidilcatecol por *H. brasilienses*.

Bioensaio de citotoxicidade realizado com *Artemia salina* mostrou que o derivado ácido é 1.400 vezes menos tóxico que o composto de origem (RAMOS *et al.*, 2012). Este resultado corrobora que a biotransformação de compostos nocivos presentes em plantas hospedeiras é uma boa estratégia para adaptação dos insetos e uma fonte de novos compostos bioativos. Neste trabalho foi realizado um estudo sobre a especificidade de lepidópteros com plantas da família Piperaceae dando enfoque nos metabólitos secundários envolvidos nesta interação e no metabolismo dos mesmos pelos insetos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a capacidade que espécies de Lepidoptera têm de biotransformar e sequestrar metabólitos secundários de espécies de *Piper* (Piperaceae).

2.2 Objetivos específicos

- Documentar a ocorrência de Lepidópteros associados a espécies de Piperaceae;
- Coletar e identificar o material botânico e entomológico;
- Submeter às espécies de Lepidoptera a dieta exclusiva com folhas de *Piper*;
- Obter extratos das folhas de Piperaceae e do material fecal dos Lepidópteros;
- Identificar os principais compostos de Piperaceae;
- Estudar o metabolismo dos compostos secundários de Piperaceae pelos Lepidópteros por CCD, CG-EM;
- Caracterizar os compostos por análise de EM.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta do material botânico

As folhas das espécies de *P. marginatum*, *P. caldense*, *P. tuberculatum* e *P. aduncum* foram coletadas no fragmento de Mata Atlântica localizado no da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Campus Sede (Recife).

3.2 Coleta do material entomológico

Os lepidópteros foram coletados no fragmento de Mata Atlântica localizado na UFRPE Campus Sede (Recife), sendo identificados como *Heraclides brasiliensis* e *Quadrus u-lucida* pelo Prof^o. Dr. Sérgio Antônio Vanin (Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo) e *Gonodonta fulvidens* pelo Prof^o. Dr. Lee A. Dyer (Departamento de Biologia da Universidade de Nevada Reno). Um lepidóptero coletado esta em processo de identificação taxonômica e foi codificada como ENI 1.

3.3 Obtenção do extrato das folhas

As folhas das espécies de *Piper* coletadas foram secas em estufa à temperatura de 50 °C durante um período de 48 horas. Após a secagem foram maceradas e submetidas a processo de extração em temperatura ambiente, utilizando como solvente o diclorometano. Os extratos obtidos foram concentrados a vácuo em um rota-evaporador a 45 °C para obtenção dos extratos brutos.

3.4 Obtenção dos extratos do material fecal

Os lepidópteros foram coletados na fase larval e criados em gaiolas teladas, mantidos em temperatura ambiente e submetidos a uma dieta exclusiva com as folhas de suas plantas hospedeiras. As folhas foram trocadas a cada 72 horas. O material fecal foi seco em temperatura de 50 °C por um período de 24 horas, sendo posteriormente macerados e extraídos com diclorometano em temperatura ambiente. Todos os extratos obtidos foram separadamente concentrados a vácuo em um rota-evaporador, obtendo-se o extrato bruto.

3.5 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrometria de massas (CG-EM)

As análises de CG-EM foram realizadas no cromatógrafo a gás, Clarus 580 PerkinElmer, acoplado ao espectrômetro de massas acoplado do modelo Clarus SQ8S, coluna elite-5MS com dimensões de 30 m x 0,25mm x 0,25µm, com sistema de injeção split flow.

Método 1 - temperatura do injetor foi mantida em 220 °C, o gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1 mL/min, razão de split 1/9, a temperatura inicial da coluna foi de 60 °C, após injeção da amostra houve a elevação de temperatura de 3°C/min até atingir a temperatura de 246 °C. Este método foi aplicado aos extratos das folhas de *P. aduncum*, *P. marginatum*, *P. tuberculatum* e aos extratos fecais dos lepidópteros, que se alimentavam destas plantas

Método 2 - temperatura do injetor foi mantida em 250 °C, o gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1 mL/min, razão de split 1/9, temperatura inicial da coluna foi de 100 °C, após injeção da amostra houve a elevação de temperatura de 10°C/min até atingir a temperatura de 290 °C, sendo mantida por 10 min. O método foi aplicado para os extratos das folhas de *P. caldense* e o fecal de *Gonodonta sp2*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Lepidópteros associados à Piperaceae

O estudo de campo foi realizado no fragmento de Mata Atlântica localizado na UFRPE Campus Sede (Recife) foi observada a ocorrência de seis espécies de Piperaceae, sendo cinco do gênero *Piper* (*P. aduncum*, *P. marginatum*, *P. arboreum*, *P. caldense* e *P. tuberculatum*) e uma do gênero *Peperomia* (*P. pellucida*). As folhas das espécies de *P. aduncum*, *P. marginatum*, *P. caldense* e *P. tuberculatum* apresentaram danos no tecido foliar em formato de semi-círculos na borda da folhas como sinais de herbivoria, sendo observado a presença de lagartas das borboletas *Gonodonta fulvidens*, *Quadrus u-lucida*, *Heraclides brasilienses* e *Gonodonta sp1*, *Gonodonta sp2* e *ENI 1* (Tabela 1)(Figura 19).



Figura 19. Lepidópteros que se alimentam de folhas de *Piper*.

Tabela 1. Ocorrência de lepidópteros em Piperaceae.

| Piperaceae | Lepidópteros | | | | | |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| | <i>Gonodonta</i> <i>sp1</i> | <i>Gonodonta</i> <i>sp2</i> | ENI 1* | <i>Gonodonta</i> <i>fluvidens</i> | <i>Q. u-</i> <i>lucida</i> | <i>H.</i> <i>brasilienses</i> |
| <i>P. aduncum</i> | -- | -- | -- | X | X | -- |
| <i>P. marginatum</i> | -- | -- | X | -- | X | X |
| <i>P. tuberculatum</i> | X | -- | X | -- | X | X |
| <i>P. caldense</i> | -- | X | -- | -- | -- | -- |

*Sem identificação taxonômica

A ausência de sinais de herbivoria em folhas de *P. arboreum* é justificada pela presença da isobutilamida 4,5-dihidropiperlonguminina, nas folhas de espécimes desta planta no estado de Pernambuco (DUARTE; PONTES; RAMOS, 2016). As isobutilamidas biossintetizadas por espécies de *Piper* são relatadas por apresentar uma potente atividade inseticida (MIYAKADO; NAKAYAMA; OHNO, 1989; SCOTT *et al.*, 2002, 2007; SK; VA; AK, 2011).

As ocorrências de lagartas das borboletas *Q. u-lucida* e *H. brasilienses* em folhas de espécies de *Piper* têm sido previamente relatadas (VANIN *et al.*, 2008). A lagarta *Q. u-lucida* foi observada se alimentando em folhas de *P. solmsianum*, *P. regnellii*, *P. callosum* e *P. richardiaefolium*, mesmo estas acumulando em suas folhas dímeros de fenilpropanoides, conhecidos como lignanas e neolignana.

A lagarta da borboleta *H. brasilienses* tem sido descrita por ocorrer em folhas de *P. regnellii* e de *P. divaricatum*, sendo que suas folhas acumulam neolignanas e safrol, respectivamente (RAMOS; BARBOSA; VANIN, 2014; VANIN *et al.*, 2008).

A lagarta da borboleta *G. fluvidens* foi observada apenas em folhas de *P. aduncum*. *Gonodonta sp1* e *Gonodonta sp2* foram observadas em folhas de *P. tuberculatum* e *P. caldense*, respectivamente, sendo este o primeiro relato da ocorrência de espécies do gênero *Gonodonta* em espécies de *Piper*. As lagartas do gênero *Gonodonta* têm sido previamente relatadas em folhas de

espécies das famílias Annonaceae, Piperaceae, Lauraceae e Solanaceae (TODD, 1959).

4.2 Estudo dos constituintes das folhas de Piperaceae metabolizado por Lepidópteros

4.2.1 *Piper aduncum*

O cromatograma do perfil químico do extrato diclorometânico das folhas de *P. aduncum* obtido por CG-EM revelou um constituinte majoritário com tempo de retenção (T_R) de 32,48 min (Figura 20).

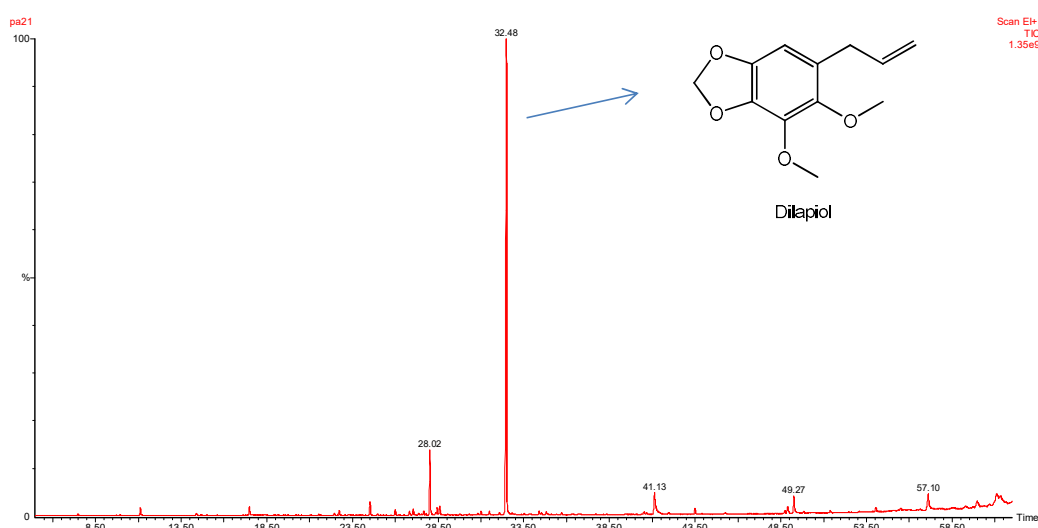


Figura 20. Perfil químico das folhas de *P. aduncum*.

Baseado na interpretação do espectro de massas foi possível identificar o composto referente ao pico em T_R de 32,48 min como o dilapiol (Figura 21), encontrado como composto majoritário do extrato das folhas de *P. aduncum*, estando de acordo com o descrito na literatura (ANDREI; BRAZ-FILHO; GOTTLIEB, 1988).

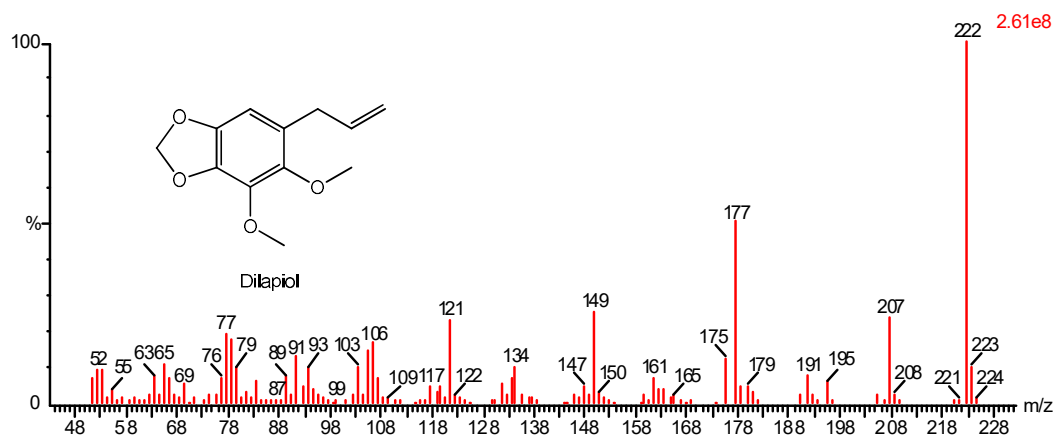


Figura 21. Espectro de massas do dilapiol.

O dilapiol está presente nas folhas, caule, fruto e raiz de *P. aduncum*. A presença na composição do dilapiol em folhas de espécimes brasileiras de *P. aduncum* variam de 35-90% (ALMEIDA *et al.*, 2009) em plantas encontradas no estado Pernambuco, este fenilpropanoide apresenta 79% da composição do óleo essencial das folhas (ARAÚJO *et al.*, 2012). Espécimes de *Piper aduncum* encontradas na Costa Rica e Cuba também apresentam o dilapiol como constituinte majoritário com 61% e 82%, respectivamente, da composição química do óleo essencial das folhas (CICCIO e BALLESTERO, 1997; PINO *et al.*, 2004).

O dilapiol é conhecido por apresentar ampla atividade acaricida, fungicida, antileishmania e atividade inseticida, por exemplo, contra larvas e insetos adultos das espécies *Anopheles marajoara* e *Aedes aegypti*, mosquitos transmissores da malária e dengue, respectivamente, além de apresentar atividade contra pragas dos besouros adulto da espécie *Cerotoma tingomarianus* e o hemíptero *Diaphorina citris* que ataca culturas de citrus (ARAÚJO *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2009; FAZOLIN *et al.*, 2005; PARISE-FILHO *et al.*, 2012; VOLPE *et al.*, 2016).

Folhas de *P. aduncum* com a presença de ovos da lagarta *G. Fluvidens* foram coletadas e mantidas em laboratório para obtenção de insetos adultos. Após 72 horas, houve a eclosão de lagartas com ciclo de 21 dias, em seguida houve a formação do casúlo, onde o inseto permaneceu como pupa durante 20 dias, emergindo como insetos adultos (Figura 22). Lagartas de *Q. u-lucida*

foram coletadas em *P. aduncum* e mantidas com dieta exclusivas de folhas frescas da planta para obtenção do material fecal.

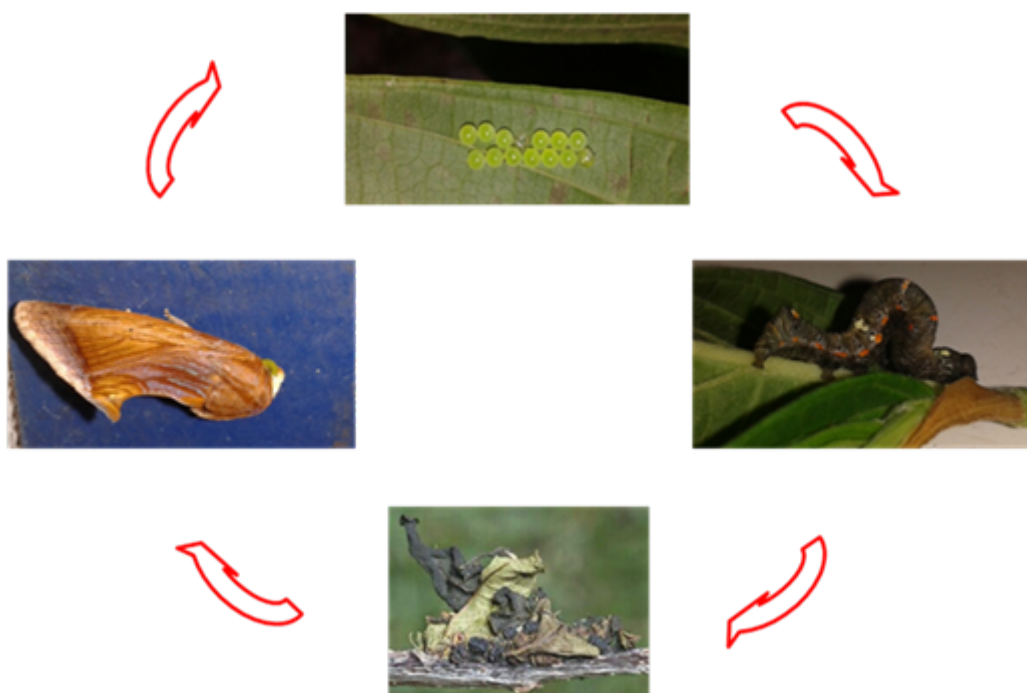


Figura 22. Ciclo de vida *G. fluvidens* em folhas de *P. aduncum*.

Ao compararmos os perfis químicos dos extratos brutos dos materiais fecais das duas lagartas com o perfil dos extratos das folhas, foi observado que o dilapiol, composto majoritário da planta, não sofre biotransformação durante o processo digestivo em ambas as lagartas (Figura 23).

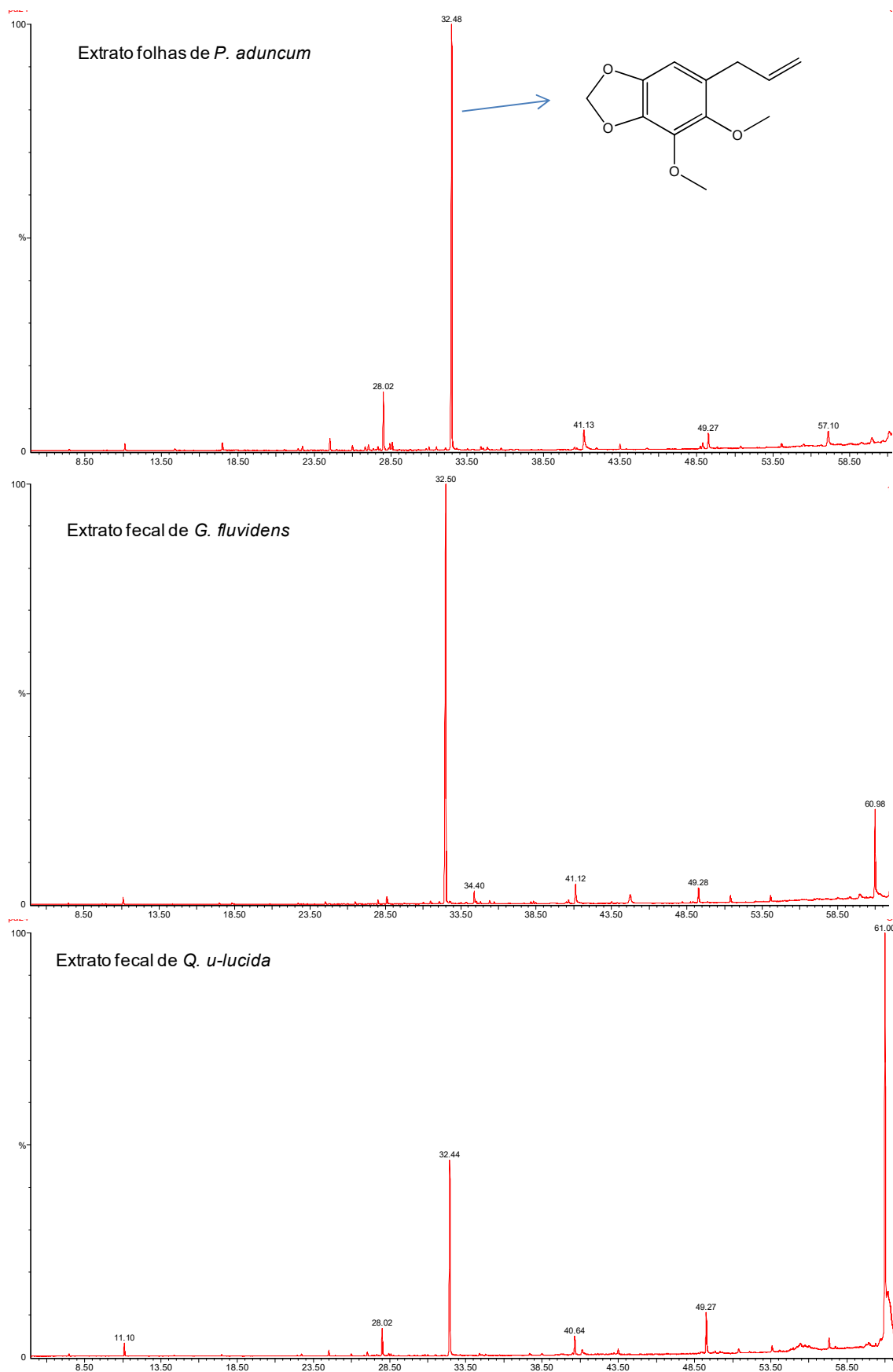


Figura 23. Perfil químico das folhas de *P. aduncum* e dos extratos fecais dos lepidópteros.

4.2.2 *Piper marginatum*

Durante as atividades de campo foram observada a presença de três espécies de lepidópteros se alimentando das folhas de *P. marginatum*, sendo duas destas espécies identificadas como *Q. u-lucida* e *H. brasilienses*. A última espécie está em processo identificação e foi codificada como ENI 1.

O perfil químico do extrato bruto das folhas de *P. marginatum* obtido por CG-EM revelou a presença de três picos com T_R de 32,4, 33,6 e 35,8 min como compostos majoritários do extrato (Figura 24).

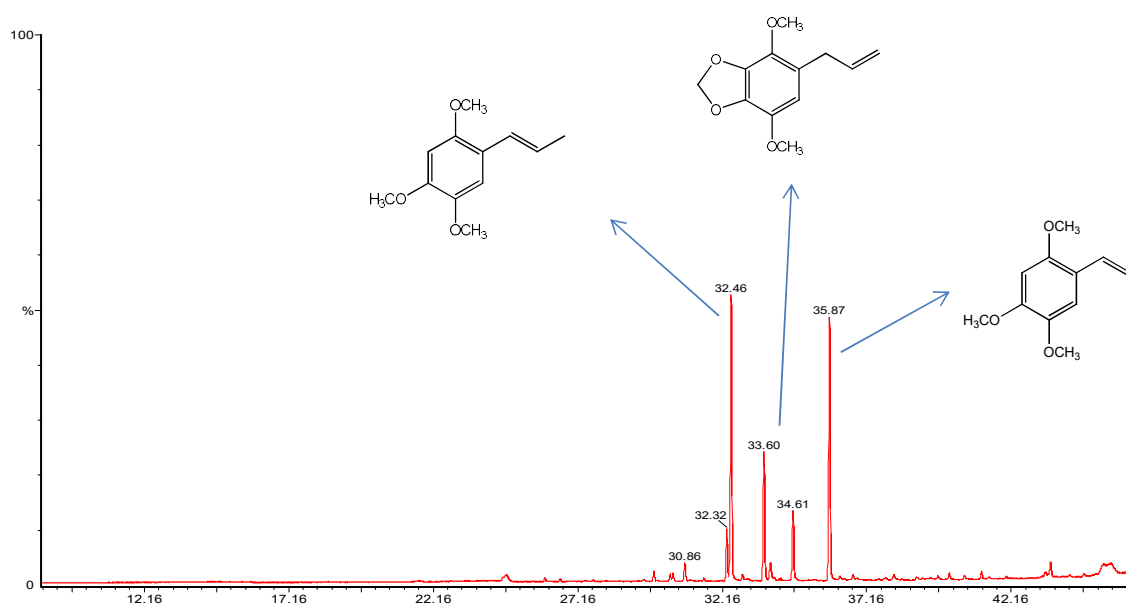


Figura 24. Perfil químico do extrato das folhas de *P. marginatum*.

Os compostos foram identificados com base na interpretação de seus respectivos espectros de massas como os fenilpropanoides: (*E*)-asarona (T_R 32,34 min), apiol (T_R 33,6 min) e (*Z*)-asarona (T_R 34,91 min) (Figura 25). Os constituintes majoritários do extrato apolar das folhas são os fenilpropanoides (*E*) e (*Z*)-asarona, sendo também os compostos majoritários identificados no óleo essencial desta planta (MORAES et al., 2014).

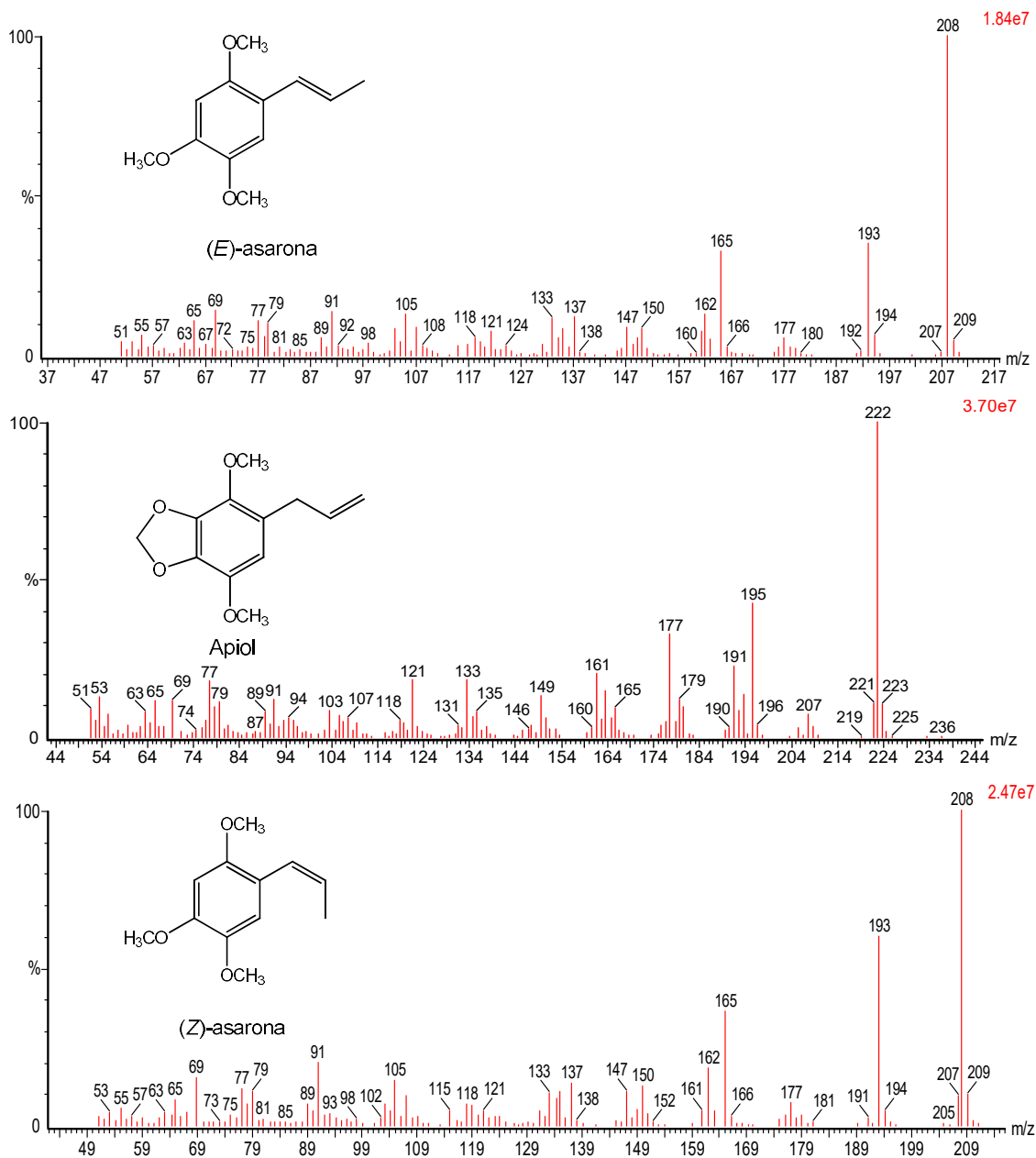


Figura 25. Espectro de massas dos fenilpropanoides (*E*)-asarona, (*Z*)-asarona e apiol identificados em *P. marginatum*.

O óleo essencial das folhas de *P. marginatum* tem sido descrito por apresentar atividade larvicida e deterrência a oviposição contra o *Aedes aegypti* (AUTRAN *et al.*, 2009). Estudos realizados com composto (*Z*)-asarona revelam que este apresenta maior atividade inseticida que o seu isômero o (*E*)-asarona, quando testados frente às lagartas *Plutella xylostella* (Lepidoptera) e *Nilaparvata lugens* (Homonoptera) (LEE; PARK; AHN, 2002).

Comparando o perfil químico do extrato das folhas com o perfil do extrato do material fecal foi observado que não houve mudanças qualitativas, indicando que os três fenilpropanoides não sofrem alterações químicas durante os seus metabolismos nas lagartas *Q. u-lucida*, *H. brasilienses* e ENI1 (Figura 26). Revelando que apesar da presença de fenilpropanoides com potente atividade inseticida, estes insetos são bastante adaptados a uma dieta de folhas ricas em fenilpropanoides.

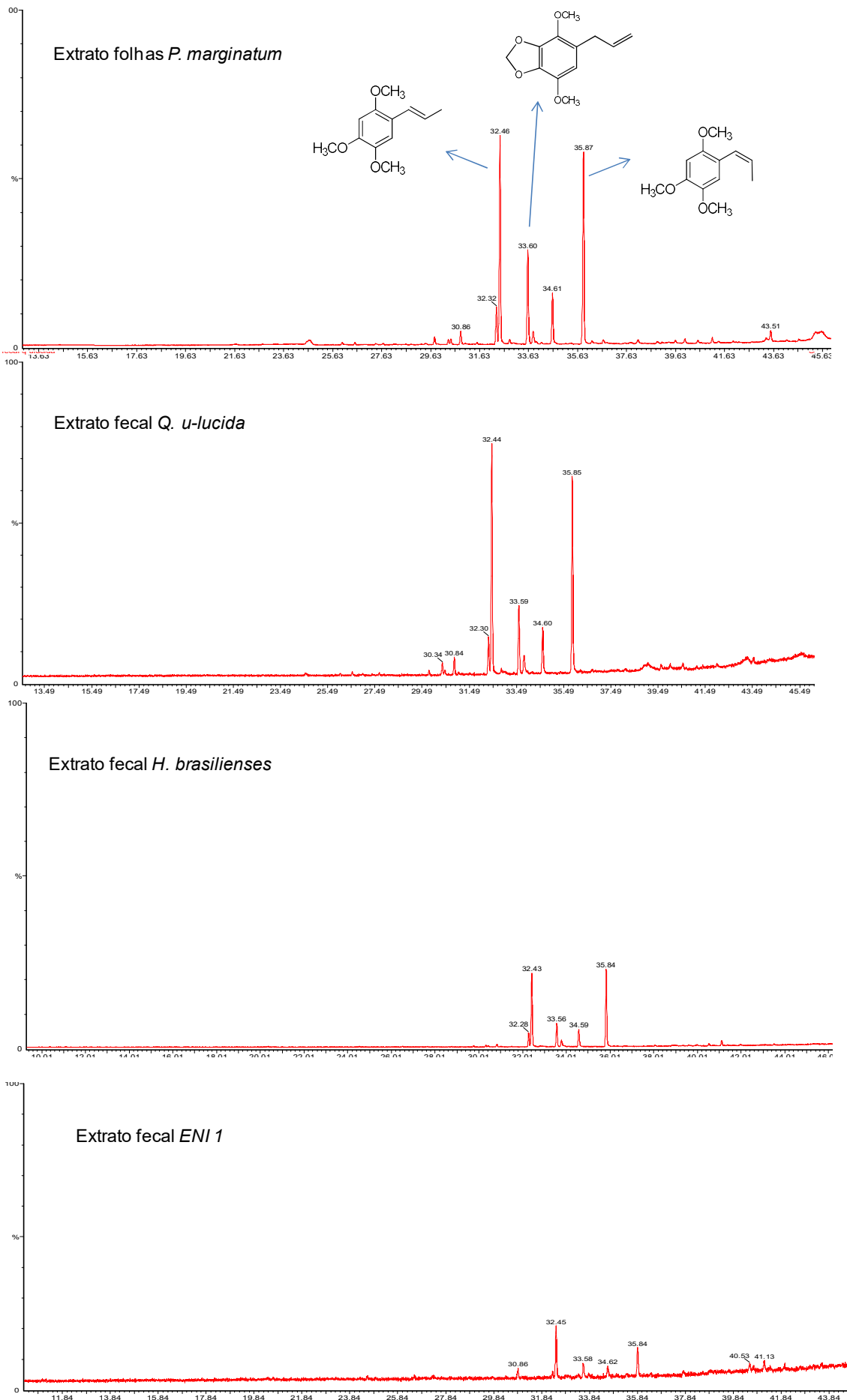


Figura 26. Perfil químico das folhas de *P. marginatum* e do material fecal dos lepidópteros.

4.2.3 *P. caldense*

Em observação de campo, as lagartas de *Gonodonta sp2* foram encontradas se alimentando naturalmente das folhas de *P. caldense*.

Estudos químicos prévios com extratos em diclorometano das folhas de *P. caldense* levaram o isolamento dos ácidos benzóico prenilados o 3-geranilgeranila-4-hidroxibenzoico e o ácido caldensínico, ambos compostos relacionados com atividade antimicrobiana (FREITAS, *et al.*, 2009, FREITAS, *et al.*, 2016).

O cromatograma do extrato das folhas de *P. caldense* obtido por CG-EM revelou como constituinte majoritário o pico T_R de 20,39 min (Figura 27).

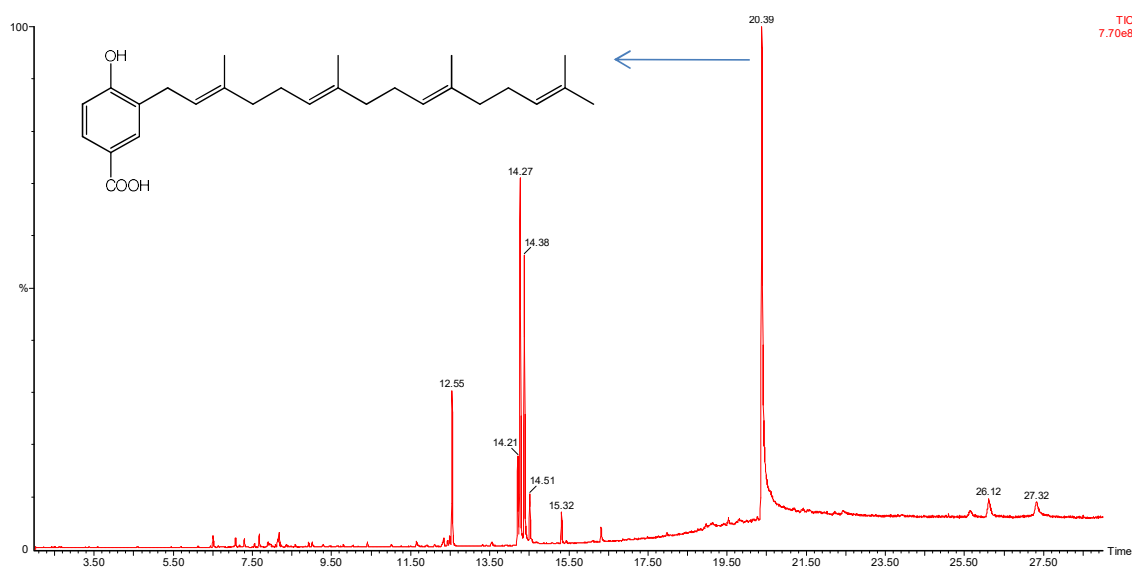


Figura 27. Perfil químico do extrato das folhas de *P. caldense*.

O padrão de fragmentação do espectro de massas do pico majoritário (T_R 20,39 min) é equivalente ao encontrado no espectro do ácido 3-geranilgeranila-4-hidroxibenzoico isolado e caracterizado por Freitas e colaboradores (2016) das folhas de *P. caldense* (Figura 28).

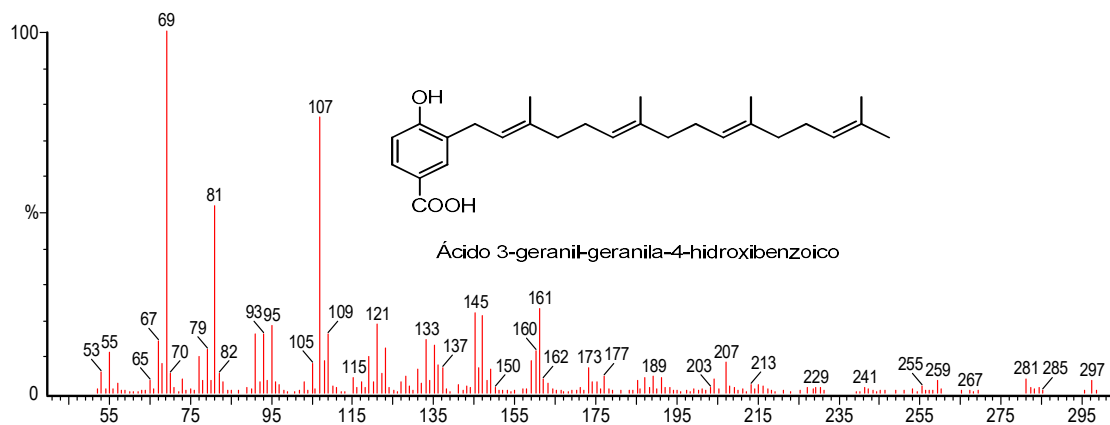


Figura 28. Espectro de massas do ácido 3-geranil-geranila-4-hidroxibenzoico.

Ao compararmos o perfil químico dos extratos das folhas de *P. caldense* com o perfil do material fecal das lagartas foi possível observar que não houve variações qualitativas na concentração do ácido benzoico entre os perfis, indicando que os insetos estão adaptados a uma dieta rica do ácido 3-geranil-geranila-4-hidroxibenzoico (Figura 29).

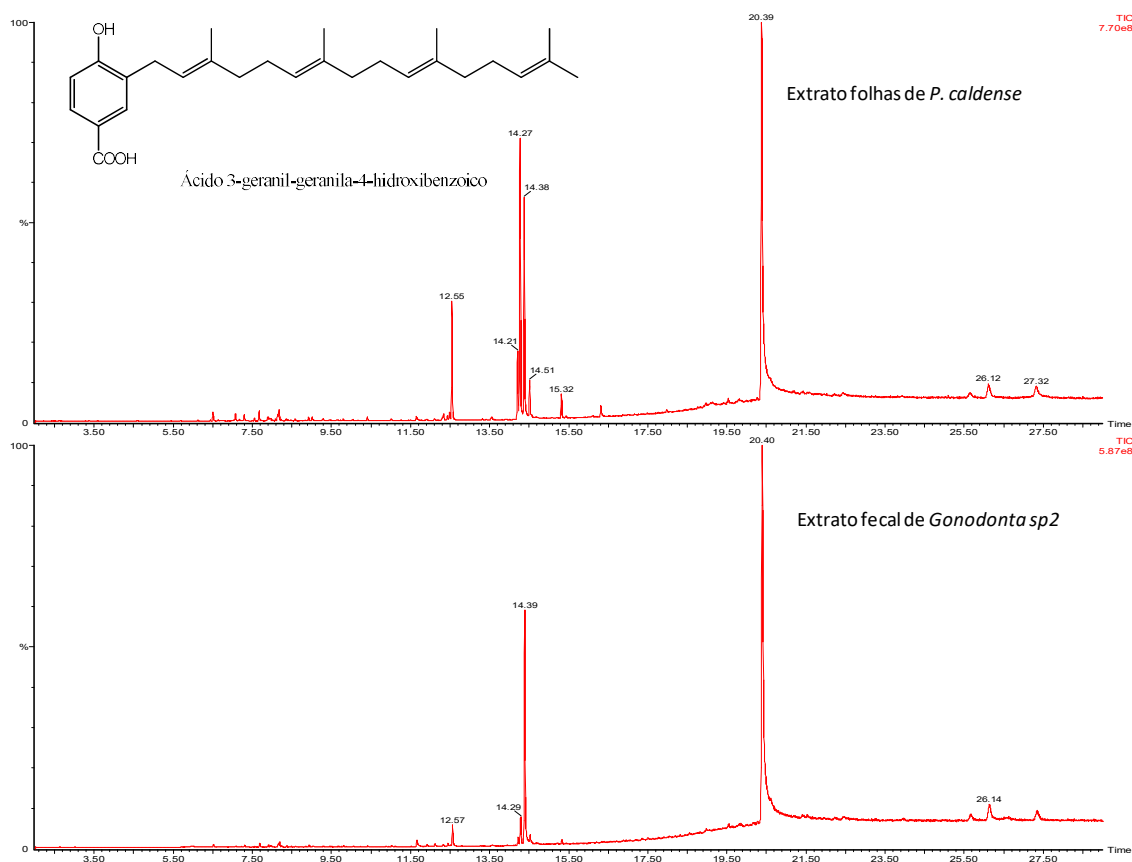


Figura 29. Perfis químicos das folhas de *P. caldense* e do material fecal de *Gonodonta sp2*.

4.2.4 *Piper tuberculatum*

Os lepidópteros relatados se alimentando das folhas de *P. tuberculatum* foram *Gonodonta sp1*, *Q. u-lucida*, *ENI 1* e *H. brasilienses*. A *P. tuberculatum* conhecida por apresentar amidas como constituintes majoritários nas raízes, folhas, sementes e caules (NAVICKIENE *et al.*, 2000; VASQUES DA SILVA *et al.*, 2002).

De acordo com Scott e colaboradores (2003, 2007), as amidas biossintetizadas por espécies de *Piper*, conhecidas também como piperamidas, apresentam propriedade inseticida, sendo estas, essenciais como mecanismos de defesa contra os insetos. A amida pelitorina isoladas de folhas e frutos de *P. tuberculatum* mostrou atividade larvicida contra a lagarta *Anticarsia gemmatilis*, uma praga da cultura de soja (NAVICKIENE *et al.*, 2007). Outras amidas como pipericida, kalecida e guineensina, isoladas da raiz de *P. guineenses* apresentaram toxicidade para os insetos adultos de *Musca domestica* (GBEWONYO; CANDY; ANDERSON, 1993). Estudos sobre o metabolismo de amidas presentes em folhas de *Piper* após digestão por insetos são escassos, por isso, faz-se necessária a investigação do metabolismo de amidas presentes em folhas de *P. tuberculatum* pelos lepidópteros.

O perfil químico do extrato das folhas de *P. tuberculatum* obtidos por CG-EM indicou a presença de dois picos com T_R 44,76 e 46,08 como constituintes majoritários das folhas desta planta (Figura 30).

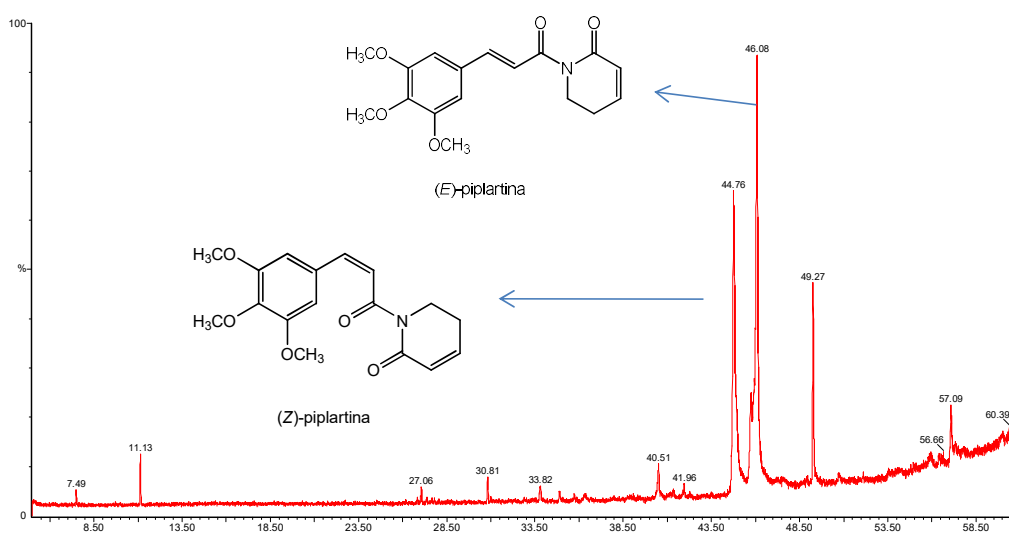


Figura 30. Perfil químico das folhas de *P. tuberculatum* por CG-EM.

Os dois picos majoritários presentes no cromatograma foram identificados através de seus espectros de massas como as amidas (*Z*)-piplartina e (*E*)-piplartina, respectivamente (Figura 31), estando de acordo com o descrito pela literatura (CHANG-YIH; YANG-CHANG; SHANG-KWEI, 1990; JOSHI; KAMAT; SAKSENA, 1968; NAVICKIENE *et al.*, 2000; VASQUES DA SILVA *et al.*, 2002).

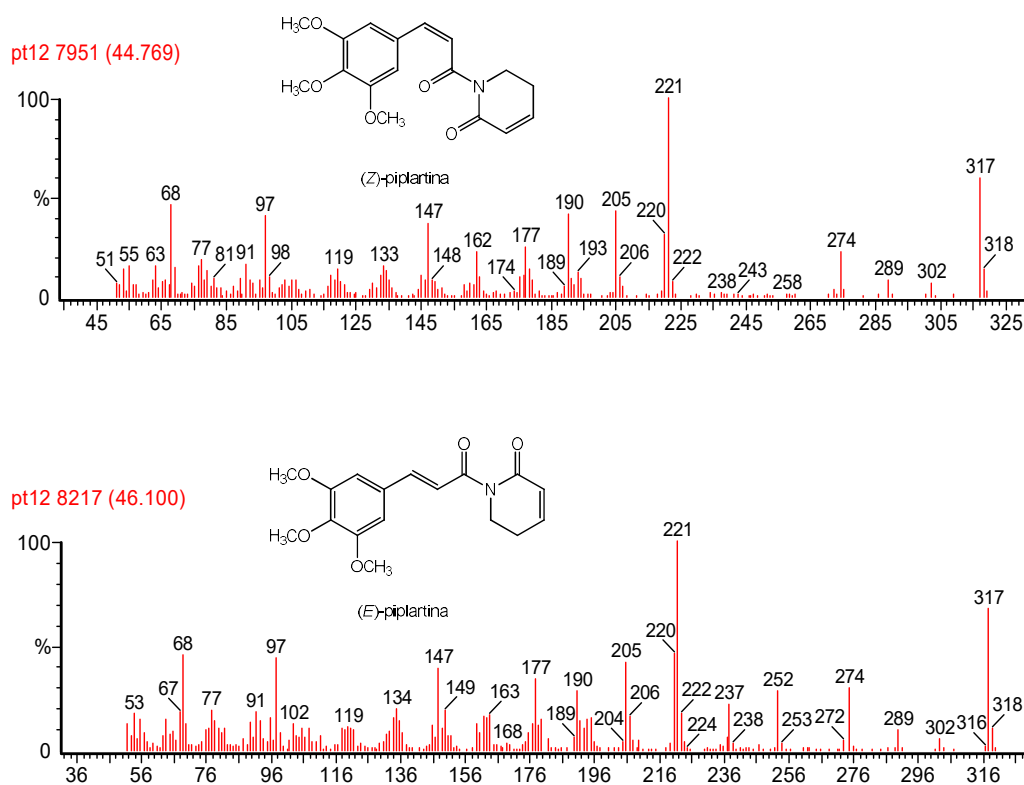


Figura 31. Amidas encontradas em *P. tuberculatum*.

Abaixo é apresentado a proposta de fragmentação para a (*E*)-piplartina (Figura 32).

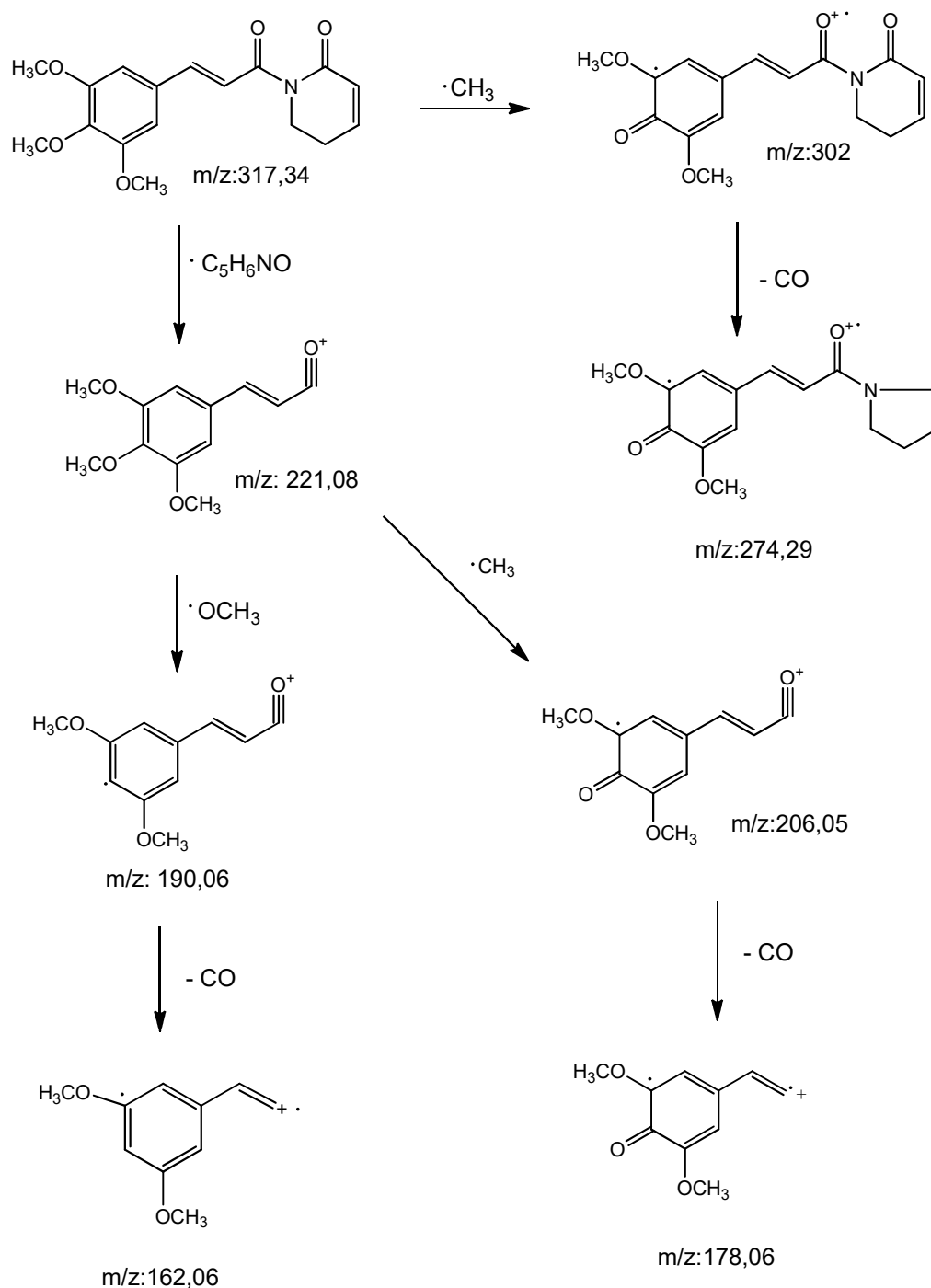


Figura 32. Proposta de fragmentação do isômero (*E*)-pipartina.

A amida (*E*)-pipartina é o constituinte majoritário das raízes e folhas de *P. tuberculatum*, sendo relatada na literatura por apresentar uma grande diversidade de atividades biológicas como antifúngica, antileucêmica, ação antiplaquetária, tripanocida, schistosomicida, leishmanicida, ansiolítico, antidepressivo, entre outras (BEZERRA *et al.*, 2007; COTINGUIBA *et al.*, 2009;

FONTENELE *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2011; REGASINI *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002). Esta amida pode ser encontrada com configuração *Z* e *E*, sendo a última mais abundante e apresentando maior atividades citotóxicas (JYOTHI *et al.*, 2009; NAVICKIENE *et al.*, 2000).

A (*E*)-piplartina apresenta também atividade larvicida frente a larvas do 3º instar de *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae), das quais o inseto adulto é o principal transmissor da malária, com valores da CL 50 e 90% nos ensaios larvicidas com 40 e 79 µg da amida, respectivamente (TRINDADE *et al.*, 2012). Apesar disso, é possível observar lepidópteros alimentando-se das folhas desta planta.

Ao compararmos o perfil químico das folhas de *P. tuberculatum* com o material fecal dos insetos (Figura 23) foi possível observar a ausência do pico referente a amida (*Z*)-piplartina e mudanças no espectro de massas do pico referente (*E*)-piplartina, indicando o metabolismo destes compostos pelos lepidópteros *Gonodonta sp1*, *H. brasilienses* e *Q. u-lucida*. No entanto, em relação ao perfil fecal do inseto ENI 1, não foi possível observar a presença das amidas ou de possíveis compostos metabolizados, o que indica um possível acúmulo destes compostos em seus tecidos.

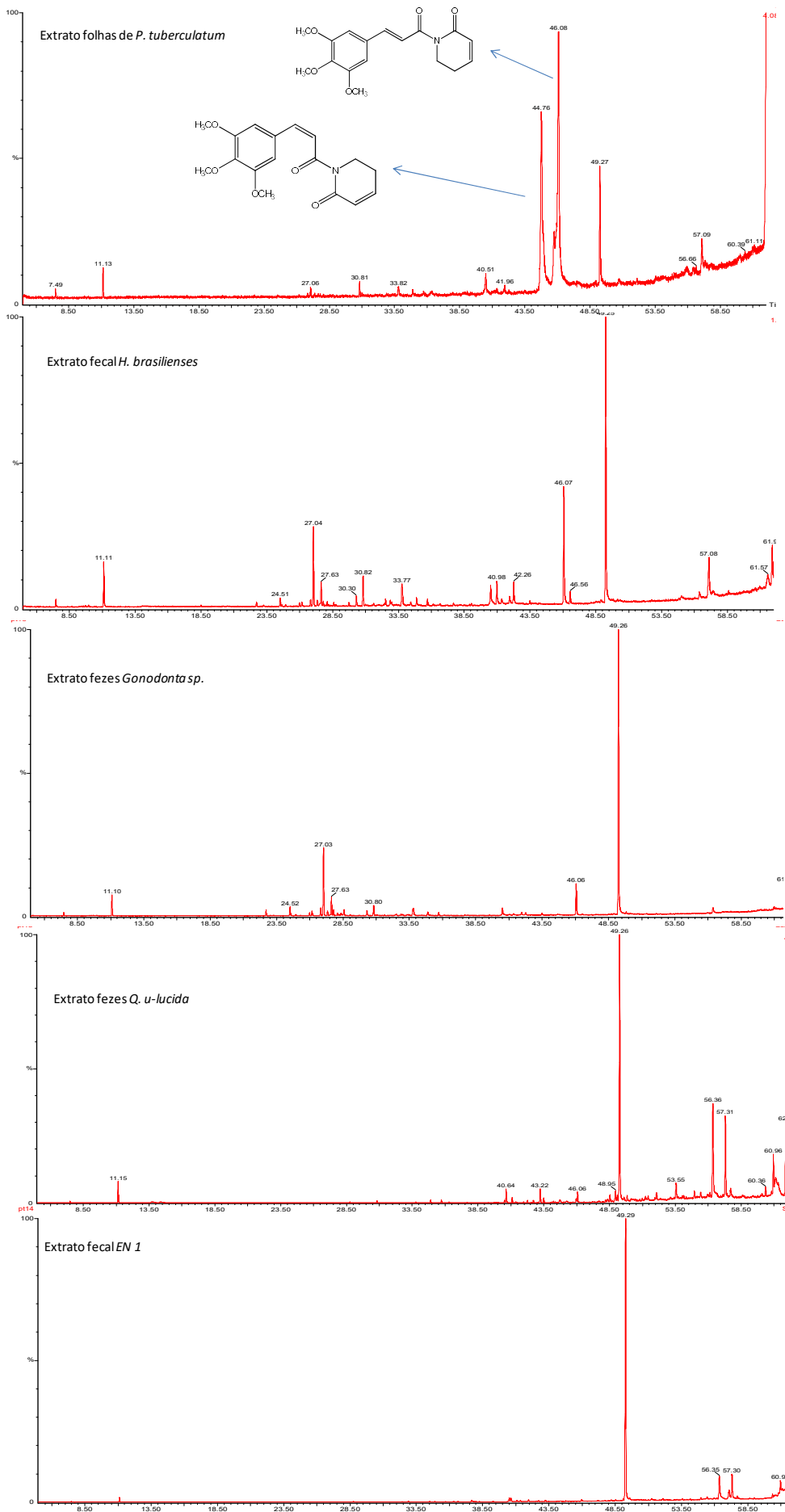


Figura 33. Perfis químicos das folhas de *P. tuberculatum* e dos materiais fecais dos lepidópteros.

As estruturas dos compostos metabolizados que correspondem ao T_R de 42,1 e 46,1 foram determinadas pela interpretação dos espectros de massas como sendo os ésteres o (*Z*)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila e o (*E*)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila, respectivamente (Figura 34), estando de acordo com os seus espectros de massas previamente descrito na literatura (KUMAR *et al.*, 2005).

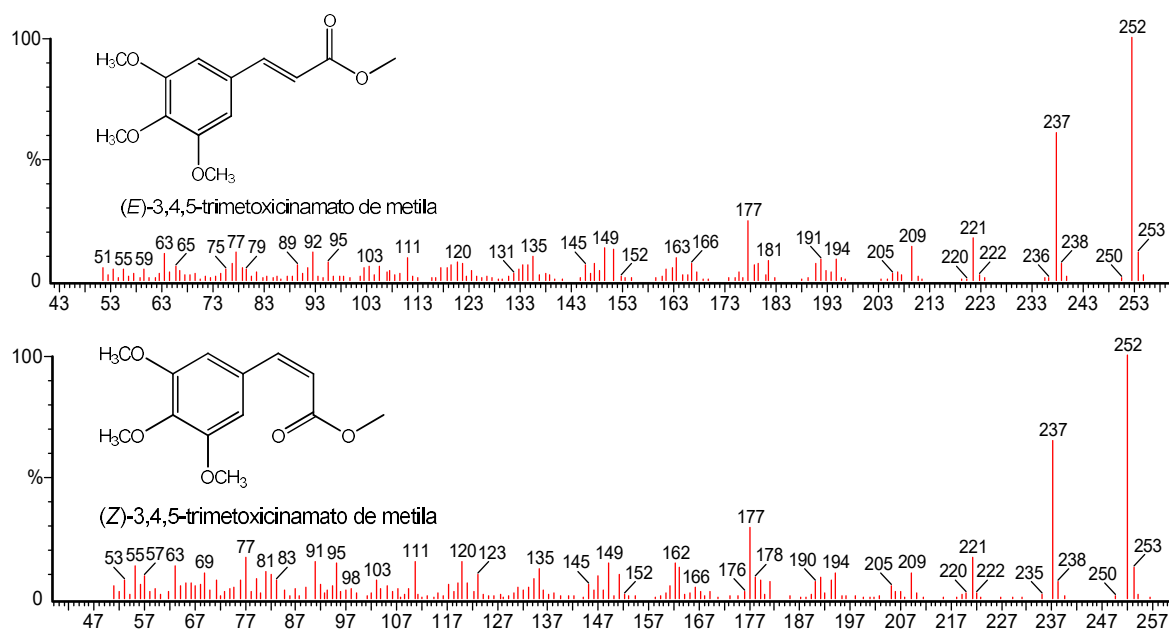


Figura 34. Espectro de massas dos compostos metabolizados.

Abaixo segue a proposta de fragmentação do (*E*)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila (Figura 35).

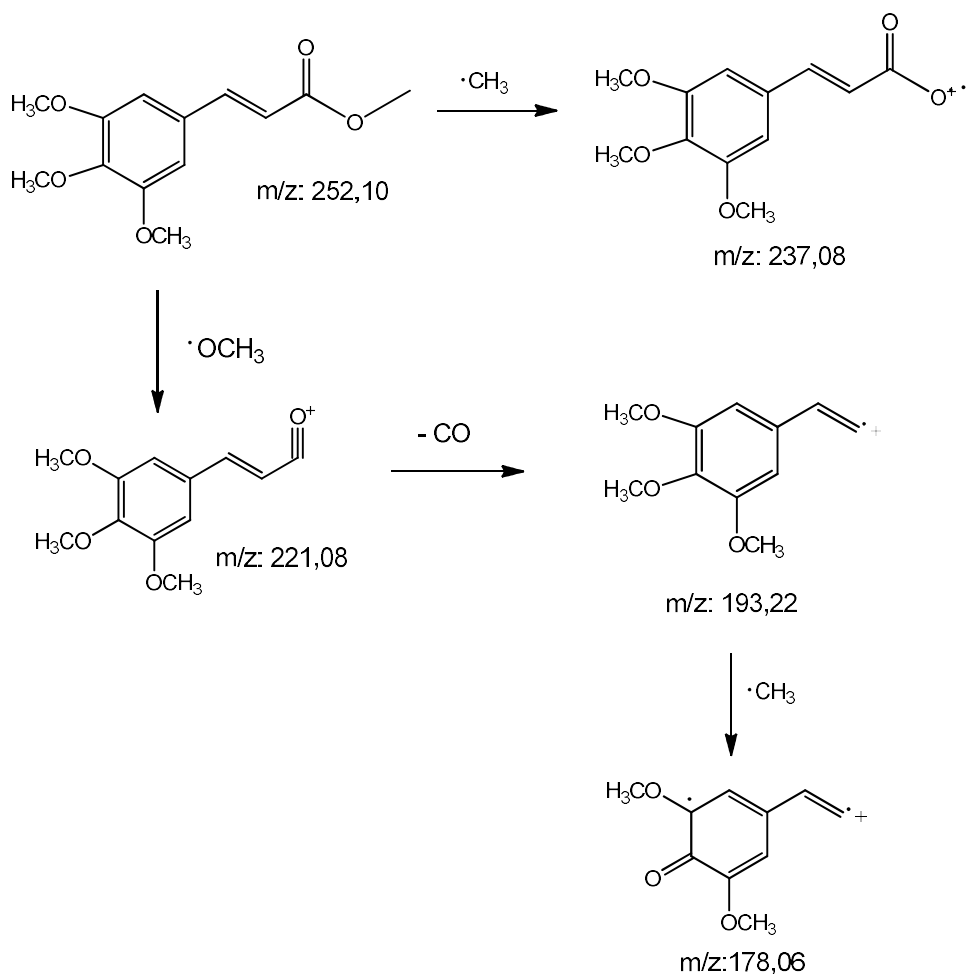


Figura 35. Proposta de fragmentação do (*E*)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila.

Os ésteres presentes no extrato fecal dos lepidópteros podem ser produtos da hidrólise da piplartina, seguida de uma esterificação que ocorre durante o processo digestivo das lagartas *Gonodonta sp1*, *H. brasilienses* e *Q. u-lucida*. A biotransformação da piplartina presentes nas folhas de *P. tuberculatum* pelas lagartas pode está associada a mecanismos usados por insetos para superar o efeito tóxico de compostos de plantas como já relatado na literatura (ENGLER; KEVIN C. SPENCER; LAWRENCE E. GILBERT, 2000; HARTMANN *et al.*, 2005; IVIE *et al.*, 1983; RAMOS *et al.*, 2012).

O metabolismo de compostos secundários por insetos geralmente leva a formação de compostos mais polares, facilitando a sua excreção e reduzindo a toxicidade dos compostos de defesa das plantas (RAMOS *et al.*, 2012; RAMOS; BARBOSA; VANIN, 2014; RAMOS; KATO, 2009, 2013; RAMOS;

VANIN; KATO, 2008). Por exemplo, o fenilpropanoide *trans*-anetol composto majóritario do óleo essencial de *Pimpinella anisum*, mostrou-se tóxico contra larvas de *S. litura*. Por outro lado, a lagarta *S. litura* é capaz de hidroxilar a cadeia lateral do *trans*-anetol durante o processo digestivo tornando-o mais polar o que facilita a excreção (PASSREITER *et al.*, 2004) (Figura 36).

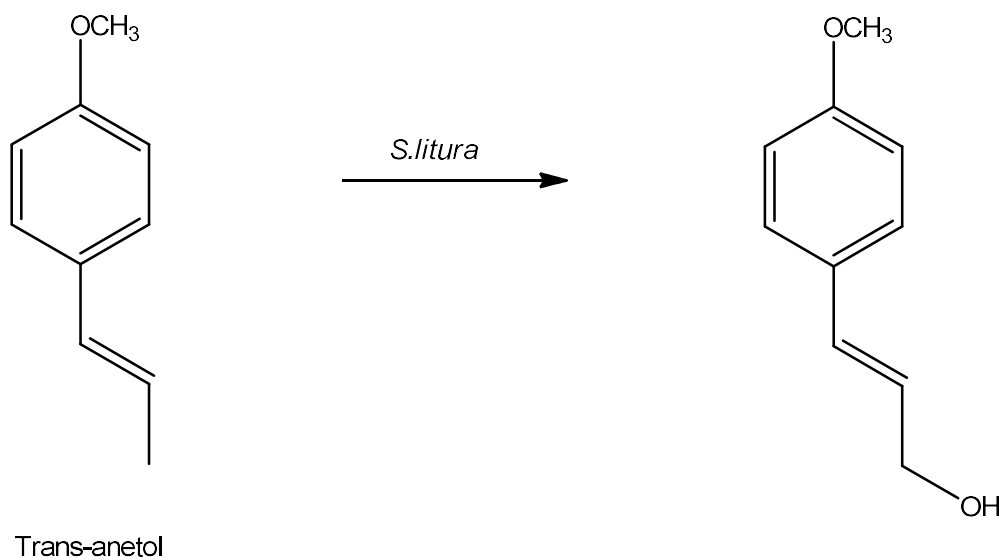


Figura 36. Metabolismo do *trans*-anetol por larvas de *S. litura*.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi relatado a ocorrência natural de seis espécies de lepidópteros em folhas de 4 espécies de plantas da família Piperaceae, sendo descrito a presença de lepidópteros do gênero *Gonodonta* e a ENI1 em plantas do gênero *Piper*. Também foi descrito a presença da largata *Q. u-lucida* se alimentando das folhas de *P. tuberculatum*, *P. aduncum*, *H. brasilienses* e *P. marginatum*.

O dilapiol foi identificado como constituinte majoritário e também como um inseticida natural presente no extrato em diclorometano das folhas de *P. aduncum*. Este fenilpropanoide não sofre biotransformação durante o processo digestivo das larvas das lepidópteras *Quadrus u-lucida* e *Gonodonta fulvidens*, sendo os perfis químicos qualitativamente e quantitativamente idênticos. Indicando adaptação das larvas em planta rica em dilapiol.

Os metabólitos secundários majoritários presentes nas folhas de *P. marginatum* foram os fenilpropanoides apiol, (*E*)-asarona e (*Z*)-asarona. Não houve variação no perfil químico das folhas de *P. marginatum* após o metabolismo dos lepidópteros *H. brasilienses*, *Q. u-lucida* e ENI1.

O ácido 3-geranil-geranila-4-hidroxibenzoico foi identificado como constituinte majoritário das folhas de *P. caldense*. Foi observado que as larvas do lepidóptero *Gonodonta sp2*, que se alimentavam naturalmente das folhas de *P. caldense*, não biotransformaram o ácido 3-geranil-geranila-4-hidroxibenzoico durante o processo digestivo.

Nas folhas de *P. tuberculatum* foi identificado como constituintes majoritários as amidas (*E*)-piplartina e (*Z*)-piplartina, conhecidas por sua atividade inseticida. Foi observada a ocorrência natural de lagartas das borboletas *Gonodonta sp1*, *Q. u-lucida*, *H. brasilienses* e ENI 1 nas folhas de *P. tuberculatum*. Estudos realizados com o material fecal destes insetos revelou que os lepidópteros *Gonodonta sp1*, *Q. u-lucida*, *H. brasilienses* são capazes de metabolizar as amidas (*E*)-piplartina e (*Z*)-piplartina para os respectivos ésteres o (*E*)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila e (*Z*)-3,4,5-trimetoxicinamato de metila. Enquanto que o perfil químico do extrato fecal da lagarta ENI 1 não

foi observada a presença das amidas ou dos compostos metabolizados, indicando um possível acúmulo destes compostos em seus tecidos.

Os resultados obtidos contribuíram para ampliar o conhecimento sobre o metabolismo de compostos secundários presentes em *Piper* por insetos, principal objeto do estudo sistemático do nosso grupo de pesquisa.

6 PERSPECTIVAS

- Realizar identificação taxonômica dos lepidópteros *Gonodonta sp1*, *Gonodonta sp2* e de ENI 1;
- Obter o perfil químico dos tecidos do lepidóptero ENI1 nas fases de larva, pupa e adulto para averiguar o possível acúmulo das amidas presentes nas folhas de *P. tuberculatum*;
- Realizar ensaios biológicos para comparar a toxicidade das amidas (Z)-(E)-piplartina, (Z)-piplartina com os compostos metabolizados pelos insetos.

7 REFERÊNCIAS

AHN, S.J. *et al.* Metabolic detoxification of capsaicin by UDP-glycosyltransferase in three *Helicoverpa* species. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 78, n. 2, p. 104–118, out. 2011.

AHN, S.J.; BADENES-PÉREZ, F. R.; HECKEL, D. G. A host-plant specialist, *Helicoverpa assulta*, is more tolerant to capsaicin from *Capsicum annuum* than other noctuid species. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 9, p. 1212–1219, 2011.

AHN, S.J.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 2, p. 133–147, 2012.

ALU'DATT, M. H. *et al.* A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 218, p. 99–106, 2017.

ANDREI, C. C.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. Allylphenols from *Ocotea cymbarum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 12, p. 3992–3993, 1988.

ARAÚJO, M. J. C. *et al.* Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 57, n. 2, p. 139–155, 2012a.

AUTRAN, E. *et al.* Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Bioresource Technology**, v. 100, n. 7, p. 2284–2288, 2009.

BADREDDINE, B. S. *et al.* Chemical composition of *Rosmarinus* and *Lavandula* essential oils and their insecticidal effects on *Orgyia trigotephras* (Lepidoptera, Lymantriidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 2, p. 98–103, 2015.

BARBOSA, Q. P. *et al.* Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. **Quimica nova**, v. 35, n. 9, p. 1806–1808, 2012.

BENEDETTI, M.; MALNOE, A.; BROILLET, A. Absorption, metabolism and excretion of safrole in the rat and man. **Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 69–83, 1977.

BERGÉ, J.; FEYEREISEN, R.; AMICHOT, M. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 353, n. 1376, p. 1701–1705, 1998.

BEZERRA, D. P. *et al.* Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2007.

BOLAND, W. Sequestration of plant-derived glycosides by leaf beetles: A model system for evolution and adaptation. **Perspectives in Science**, v. 6, p. 38–48, 2015.

BRAGA, N. P.; CREMASCO, M. A.; VALLE, R. C. The effects of fixed-bed drying on the yield and composition of essential oil from long pepper (*Piper hispidinervium* C. DC) leaves. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 2, p. 257–262, 2005.

CABRAL, M. M. O. *et al.* Larvicidal Activity of Grandisin Against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, n. 1, p. 103–105, 2009.

CHANG-YIH, D.; YANG-CHANG, W.; SHANG-KWEI, W. Cytotoxic pyridone alkaloids from *Piper aborescens*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2689–2691, 1990.

CHEN, S. *et al.* Neolignans and phenylpropanoids from the roots of *Piper taiwanense* and their antiplatelet and antitubercular activities. **Phytochemistry**, v. 93, p. 203–209, 2013.

CICCIO, J. F.; BALLESTERO, C. M. Volatile components of *Piper aduncum* (Piperaceae) leaves and spikes from Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical**, n. 45, p. 783–790, 1997.

BEZERRA C. F. F. *et al.* Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v. 14, n. 9, p. 605–612, 2007.

COTINGUIBA, F. *et al.* Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703–711, 2009.

CRONIN, J. T.; ABRAHAMSON, W. G. Do parasitoids diversify in response to host-plant shifts by herbivorous insects? **Ecological Entomology**, v. 26, n. 4, p. 347–355, 2001.

DAL PICOLO, C. R. *et al.* Antileishmanial activity evaluation of adunchalcone, a new prenylated dihydrochalcone from *Piper aduncum* L. **Fitoterapia**, v. 97, p. 28–33, 2014.

ALMEIDA, R. R. P. *et al.* Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 9, p. 1427–1434, 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd edition ed. Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley, A John Wiley and Sons, Ltd., Publication, 2009.

DUARTE, M. S.; PONTES, M. J. C.; RAMOS, C. S. Differentiation of the Chemical Profile of *Piper arboreum* Tissues Using NIR Spectrometry and Principal Component Analysis. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 82, n. 6, p. 1042–1045, 2016.

TODD E.L. The fruit-piercing moths of the genus *Gonodonta* HUBNER (Lepidoptera, Noctuidae). **Technical Bulletin**, v. 1201, p. 1–52, 1959.

ENGLER, H. S.; SPENCER, K. C.; LAWRENCE E. G. Insect metabolism: Preventing cyanide release from leaves. **Nature**, v. 406, p. 144–145, 2000.

ERB, M.; ROBERT, C. A. Sequestration of plant secondary metabolites by insect herbivores: molecular mechanisms and ecological consequences. **Current Opinion in Insect Science**, v. 14, p. 8–11, 2016.

ESTRELA, J. L. V. *et al.* Toxicidade de amidas análogas à piperina a larvas de *Ascia monuste orseis* Godart (Lepidoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, p. 343–346, 2003.

FAZOLIN, M. *et al.* Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 3, p. 485–489, 2005.

FAZOLIN, M. *et al.* Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 113–120, 2007.

FLEMING, T. H. Fecundity, fruiting pattern, and seed dispersal in *Piper amalago* (Piperaceae), a bat-dispersed tropical shrub. **Oecologia**, v. 51, n. 1, p. 42–46, 1981.

FLORES, N. *et al.* Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 621–627, 2009.

FONTENELE, J. B. *et al.* Antiplatelet effects of piplartine, an alkalamide isolated from *Piper tuberculatum*: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 4, p. 511–515, 2009.

FREITAS, G. C. *et al.* Caldensinic acid, a prenylated benzoic acid from *Piper caldense*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 119–122, 2009.

FREITAS, L. A. B. *et al.* Chemical Profiles and Antimicrobial Activity of *Piper caldense* Tissues. **Annals of Chromatography and Separation Techniques**, v. 2, n. 3, p. 1–3, 2016.

GBEWONYO, W. S. K.; CANDY, D. J.; ANDERSON, M. Structure-activity relationships of insecticidal amides from *Piper guineense* root. **Pesticide Science**, v. 37, n. 1, p. 57–66, 1993.

GLENDINNING, J. I. How do herbivorous insects cope with noxious secondary plant compounds in their diet? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 104, n. 1, p. 15–25, 2002.

GREENEY, H.; LA DYER; A.M. SMILANICH. Feeding by lepidopteran larvae is dangerous: A review of caterpillars' chemical, physiological, morphological, and behavioral defenses against natural enemies. **Invertebrate Survival Journal**, v. 9, p. 7–34, 2012.

GUIMARÃES, E. F.; CARVALHO-SILVA, M. Uma nova espécie e novos nomes em *Piper* seção *Ottonia* (Piperaceae) para o Sudeste do Brasil. **Hoehnea**, v. 36, n. 3, p. 431–435, 2009.

GUTIERREZ, Y. V. *et al.* Natural products from *Peperomia*: occurrence, biogenesis and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 6, p. 1009–1033, 2016.

HARMATHA, J.; NAWROT, J. Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 104, n. 1, p. 51–60, 2002.

HARTMANN, T. Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. **Planta**, v. 219, n. 1, p. 1–4, 2004.

HARTMANN, T. *et al.* Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 5, p. 391–411, 2005.

HARTMANN, T.; OBER, D. Biosynthesis and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants and Specialized Insect Herbivores. In: LEEPER, F. J.; VEDERAS, J. C. (Eds.). **Biosynthesis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v. 209p. 207–243, 2000..

HEIDEL-FISCHER, H. M.; VOGEL, H. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. **Current Opinion in Insect Science**, v. 8, p. 8–14, 2015.

HERRERA, C. M.; PELLMYR, O. (EDS.). **Plant-animal interactions: an evolutionary approach**. Oxford, UK ; Malden, MA: Blackwell Science, 2002.

HIRAYAMA, C. *et al.* Regioselective formation of quercetin 5-O-glucoside from orally administered quercetin in the silkworm, *Bombyx mori*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1141–1149, 2008.

HORI, M. *et al.* Chemicals affecting the feeding preference of the *Solanaceae*-feeding lady beetle *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae): Chemical factors of feeding of *H. vigintioctomaculata*. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 1–2, p. 121–131, 2011.

HUANG, R. T. *et al.* Determination of phenolic acids and flavonoids in *Rhinacanthus nasutus* (L.) kurz by high-performance-liquid-chromatography with photodiode-array detection and tandem mass spectrometry. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 498–508, 2015.

IVIE, G. W. *et al.* Metabolic Detoxification: Mechanism of Insect Resistance to Plant Psoralens. **Science**, v. 221, n. 4608, p. 374–376, 1983.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706–716, 2001.

JEFFREY, C. S. *et al.* Antiherbivore Prenylated Benzoic Acid Derivatives from *Piper kelleyi*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 1, p. 148–153, 2014.

JEONG, H.J. *et al.* Flavokawains B and C, melanogenesis inhibitors, isolated from the root of *Piper methysticum* and synthesis of analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 4, p. 799–802, 2015.

MIRANDA J.E. *et al.* Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (HUEBNER, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras**, p. 557–563, 2002.

JOSHI, B. S.; KAMAT, Y. N.; SAKSENA, A. K. On the structure of piplartine and a synthesis of dihydropiplartine. **Tetrahedron Letters**, v. 9, n. 20, p. 2395–2400, 1968.

JYOTHI, D. *et al.* Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of piplartine isolated from *Piper chaba*. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1085–1091, 2009.

KUMAR, P. *et al.* Natural history-driven, plant-mediated RNAi-based study reveals CYP6B46's role in a nicotine-mediated antipredator herbivore defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, p. 1245–1252, 2014.

KUMAR, S. *et al.* Novel Aromatic Ester from *Piper longum* and Its Analogues Inhibit Expression of Cell Adhesion Molecules on Endothelial Cells †. **Biochemistry**, v. 44, n. 48, p. 15944–15952, 2005.

LAMPERT, E. C.; DYER, L. A.; BOWERS, M. D. Caterpillar Chemical Defense and Parasitoid Success: *Cotesia congregata* Parasitism of *Ceratonia catalpae*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 9, p. 992–998, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.. Secondary Metabolites and Plant Defense. In: **Plant Physiology**. Sunderland: p. 208–308, 2010.

LEE, H.K.; PARK, C.; AHN, Y.J. Insecticidal activities of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutoidea). **Applied Entomology and Zoology**, v. 37, n. 3, p. 459–464, 2002.

DYER, L. A. Effectiveness of caterpillar defenses against three species of invertebrate predators. **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 34, p. 48–68, 1996.

LEVY, S. M. *et al.* Morphological study of the hindgut in larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 4, p. 427–431, 2004.

LIMA, R. K. *et al.* Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 377–382, 2009.

LUYEN, B. T. T. *et al.* A new phenylpropanoid and an alkylglycoside from *Piper retrofractum* leaves with their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 17, p. 4120–4124, 2014.

MAAG, D. *et al.* 3- β -d-Glucopyranosyl-6-methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA-N-Glc) is an insect detoxification product of maize 1,4-benzoxazin-3-ones. **Phytochemistry**, v. 102, p. 97–105, jun. 2014.

MACÍAS, F. A. *et al.* Rediscovering the bioactivity and ecological role of 1,4-benzoxazinones. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 4, p. 478, 2009.

MADHUMATHY, A.P.; AIVAZI, A.A.; VIJAYAN, V.A. Larvicidal efficacy of *Capsicum annum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 44, n. 3, p. 223–226, 2007.

MARTINS, R. C. *et al.* Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 843–846, 2000.

MCEVOY, P. B. Insect-plant interactions on a planet of weeds. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 104, n. 1, p. 165–179, 2002.

MCLEAN, S.; DUNCAN, A.J. Pharmacological Perspectives on the Detoxification of Plant Secondary Metabolites: Implications for Ingestive Behavior of Herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 6, p. 1213–1228, 2006.

MESSIANO, G. B. *et al.* In vitro metabolism study of the promising anticancer agent the lignan (-)-grandisin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, p. 240–244, 2013.

MIYAKADO, M.; NAKAYAMA, I.; OHNO, N. Insecticidal Unsaturated Isobutylamides: From Natural Products to Agrochemical Leads. **Insecticides of Plant Origin**. Washington, DC: American Chemical Society, v. 387p. 173–187, 1989.

MIYAZAWA, M.; MIYAMOTO, Y. Biotransformation of (1R)-(+)- and (1S)-(-)-camphor by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, n. 2–3, p. 83–89, 2004.

- MONTEIRO, D. Piperaceae em um fragmento de floresta atlântica da Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 64, n. 2, p. 379–398, 2013.
- MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. Flora do parque nacional do itatiaia – brasil: *Manekia* e *Piper* (Piperaceae). **Rodriguesia**, v. 60, p. 999–1024, 2009.
- MORAES, M. M. *et al.* Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 3, p. 270–277, 2014.
- MORAES, J. *et al.* *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 357–364, 2011.
- MORANT, A. V. *et al.* β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1795–1813, 2008.
- NAVICKIENE, H. M. D. *et al.* Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 621–626, 2000.
- NAVICKIENE, H. M. D. *et al.* Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Pest Management Science**, v. 63, n. 4, p. 399–403, 2007.
- NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 47, n. 1, p. 57–92, 2002.
- NISHIDA, R. Chemical ecology of insect–plant interactions: ecological significance of plant secondary metabolites. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 1–13, 2014.
- ONYILAGHA, J. C. *et al.* Constitutive flavonoids deter flea beetle insect feeding in *Camelina sativa* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 128–133, jun. 2012.
- PARISE-FILHO, R. *et al.* Dillapiole as Antileishmanial Agent: Discovery, Cytotoxic Activity and Preliminary SAR Studies of Dillapiole Analogues. **Archiv der Pharmazie**, v. 345, n. 12, p. 934–944, 2012.
- PARK, B.-S. *et al.* Insecticidal and acaricidal activity of piperonaline and piperoctadecalidine derived from dried fruits of *Piper longum* L. **Crop Protection**, v. 21, n. 3, p. 249–251, 2002.
- PARMAR, V. S. *et al.* Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597–673, 1997.
- PASSREITER, C. M. *et al.* Metabolism of thymol and trans-anethole in larvae of *Spodoptera litura* and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 9, p. 2549–2551, 2004.

PENTZOLD, S. *et al.* The Multiple Strategies of an Insect Herbivore to Overcome Plant Cyanogenic Glucoside Defence. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91337, 2014.

PETERSEN, R. A. *et al.* Expression of CYP6B1 and CYP6B3 cytochrome P450 monooxygenases and furanocoumarin metabolism in different tissues of *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae). **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 31, n. 6, p. 679–690, 2001.

PETSCHENKA, G.; AGRAWAL, A. A. How herbivores coopt plant defenses: natural selection, specialization, and sequestration. **Current Opinion in Insect Science**, v. 14, p. 17–24, 2016.

PINO, J. A. *et al.* Essential Oils of *Piper peltata* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 2, p. 124–126, 2004.

PINTO, A. C. S. *et al.* In vitro cytotoxicity of *Pothomorphe peltata* (L.) Miquel (Piperaceae), isolated 4-nerolidylcatechol and its semi-synthetic diacetyl derivative. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 205–211, 2006.

PINTO, C. F. *et al.* Sequestration of tropane alkaloids from *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae) by the treehopper *Alchisme grossa* (Hemiptera: Membracidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 66, p. 161–165, 2016.

RAMIREZ, J. *et al.* Antifungal activity of raw extract and flavanons isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 370–373, 2013.

RAMOS, C. S. *et al.* Biotransformation of 4-nerolidylcatechol by *Heraclides brasiliensis* (Lepidoptera: Papilionidae) reduces the toxicity of *Piper umbellata* (Piperaceae). **Chemoecology**, v. 22, n. 1, p. 39–45, 2012.

RAMOS, C. S.; BARBOSA, Q. P. S.; VANIN, S. A. Metabolism of Safrole by *Heraclides thoas brasiliensis* (Papilionidae). **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 68, n. 4, p. 283–285, 2014.

RAMOS, C. S.; KATO, M. J. Hydrolysis of methyl benzoate from *Piper arboreum* by *Naupactus bipes* beetle. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 560–563, 2009.

RAMOS, C. S.; KATO, M. J. Metabolism of neolignans from *P. regnellii* (Piperaceae) in the beetle *Naupactus bipes* (Coleoptera: Curculionidae). **Chemoecology**, v. 23, n. 3, p. 143–148, 2013.

RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Metabolism of (–)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2157–2161, 2008.

RAO, V. R. S. *et al.* Novel dimeric amide alkaloids from *Piper chaba* Hunter: isolation, cytotoxic activity, and their biomimetic synthesis. **Tetrahedron**, v. 67, n. 10, p. 1885–1892, 2011.

RASMANN, S.; ALVAREZ, N.; PELLISSIER, L. The altitudinal niche-breadth hypothesis in insect-plant interactions. In: **Insect-Plant Interactions**. v. 47, p. 339-360, 2014.

REGASINI, L. O. *et al.* Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 199–203, 2009.

REZENDE, K. C. S. *et al.* Antibacterial activity of (–)-cubebin isolated from *Piper cubeba* and its semisynthetic derivatives against microorganisms that cause endodontic infections. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 296–303, 2016.

RIBEIRO, N.; CAMARA, C.; RAMOS, C. Toxicity of essential oils of *Piper marginatum* Jacq. against *Tetranychus urticae* Koch and *Neoseiulus californicus* (McGregor). **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 1, p. 71–76, 2016.

RICHARDS, L. A. *et al.* Synergistic Effects of Amides from Two *Piper* Species on Generalist and Specialist Herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 10, p. 1105–1113, 2010.

RYAN, M. F.; BYRNE, O. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 10, p. 1965–1975, 1988.

SALMINEN, J.P. *et al.* Metabolic modifications of birch leaf phenolics by an herbivorous insect: detoxification of flavonoid aglycones via glycosylation. **Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences**, v. 59, n. 5–6, p. 437–444, 2004.

SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Structure and Function of Cytochrome P450S in Insect Adaptation to Natural and Synthetic Toxins: Insights Gained from Molecular Modeling. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 9, p. 1232–1245, 2013.

SCOTT, I. M. *et al.* Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, n. 2, p. 137–144, 2002.

SCOTT, I. M. *et al.* Botanical insecticides for controlling agricultural pests: Piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae): Piperamides and *L. decemlineata*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 54, n. 4, p. 212–225, 2003.

SCOTT, I. M. *et al.* A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 65–75, 2007.

SELIN-RANI, S. *et al.* Toxicity and physiological effect of quercetin on generalist herbivore, *Spodoptera litura* Fab. and a non-target earthworm *Eisenia fetida* Savigny. **Chemosphere**, v. 165, p. 257–267, 2016.

SIMÕES, C. M. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004. v. 5

MADHU, S.K.; VIJAYAN, V.A.; SHAUTKATH, A.K. Bioactivity guided isolation of mosquito larvicide from *Piper longum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 2, p. 112–116, 2011.

SMITH, J. F. *et al.* Placing the origin of two species-rich genera in the late cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 275, n. 1–2, p. 9–30, 2008.

STRAUSS, A. S. *et al.* ABC transporter functions as a pacemaker for sequestration of plant glucosides in leaf beetles. **Elife**, v. 2, p. e01096, 2013.

TAYLOR, D. W.; HICKEY, L. J. Phylogenetic evidence for the herbaceous origin of angiosperms. **Plant Systematics and Evolution**, v. 180, n. 3–4, p. 137–156, 1992.

TRINDADE, F. T. T. *et al.* Evaluation of larvicidal activity of the methanolic extracts of *Piper alatabaccum* branches and *P. tuberculatum* leaves and compounds isolated against *Anopheles darlingi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 979–984, 2012.

VANIN, S. A. *et al.* Insect feeding preferences on Piperaceae species observed in São Paulo city, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 1, p. 72–77, 2008.

SILVA, R.V. *et al.* Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 521–527, 2002.

VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 105–113, 2015.

VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**, v. 38, n. 1, p. 11–36, 2000.

PARMA, V.S. *et al.* Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597–673, 1997.

VOELCKEL, C. (ED.). **Insect-plant interactions**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2014.

VOLPE, H. X. *et al.* Efficacy of essential oil of *Piper aduncum* against nymphs and adults of *Diaphorina citri*: Efficacy of *P. aduncum* essential oil against *D. citri*. **Pest Management Science**, v. 72, n. 6, p. 1242–1249, 2016.

WÖLL, S. *et al.* Animal plant warfare and secondary metabolite evolution. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2013.

ZAGROBELNY, M. *et al.* Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 293–306, 2004.

ZAGROBELNY, M. *et al.* Sequestration, tissue distribution and developmental transmission of cyanogenic glucosides in a specialist insect herbivore. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 44, p. 44–53, 2014.

ZVEREVA, E. L.; RANK, N. E. Host plant effects on parasitoid attack on the leaf beetle *Chrysomela lapponica*. **Oecologia**, v. 135, n. 2, p. 258–267, 2003.